

**Oktaedrische vakuoläre Proteinkristalle
in *Phycomyces blakesleeanus*:
Biochemische und fluoreszenzspektroskopische
Charakterisierung**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Volker Fries
aus Marburg

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Paul Galland

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2004

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Tropismen	1
1.1.1 Gravitropismus	1
1.1.1.1 Statolithen als Gravisuszeptoren	2
1.1.2 Phototropismus	2
1.1.2.1 Photorezeptoren	2
1.1.2.2 Cryptochrom / DNA-Photolyase	3
1.1.2.3 Mechanismus und Struktur der DNA-Photolyase von <i>Escherichia coli</i>	3
1.1.2.4 Cryptochrome aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
1.1.2.5 Nitrat-Reduktase	5
1.1.2.6 Primärreaktion	5
1.1.2.7 Flavine	6
1.1.2.8 Pterine	8
1.2 <i>Phycomyces blakesleeanus</i> :	
Modellorganismus für die Wirkung von UV-A, Blaulicht und anderer Umweltsignale	10
1.2.1 Reaktion auf externe Stimuli	12
1.2.1.1 Gravitropismus und Gravisuszeption bei <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	13
1.2.1.2 Interaktion von Phototropismus und Gravitropismus	15
2 Zielsetzung	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Chemikalien	19
3.2 Geräte	20
3.3 Pilzmaterial	22
3.3.1 Verwendete Stämme	23
3.3.1.1 Genetische Bezeichnung	23
3.3.1.2 Mutagenisierung	23
3.3.1.3 Kreuzung	24
3.3.2 Anzucht	24
3.3.2.1 Herstellen der Sporensuspension	24
3.3.2.2 Kulturmedien	25
3.3.2.3 Wachstums- und Anzuchtbedingungen	25
3.3.2.4 Petrischalenkultur	26
3.3.2.4.1 Stadium-I-Sporangiophoren	26
3.3.2.4.2 Myzel und Stadium-I-Sporangiophoren für Expressionsstudien	26
3.3.2.4.3 Einzelsporangiophoren	27
3.3.2.5 Myzel-Flüssigkultur	28
3.3.3 Erntemethoden	28
3.3.3.1 Sporangiohoren aus Petrischalenkultur	28
3.3.3.2 Myzel aus Petrischalenkultur	28
3.3.3.3 Einzelsporangiophoren	29
3.3.3.4 Myzel aus Flüssigkultur	29
3.4 Kristallisierung	29
3.4.1 Vorreinigung	29
3.4.2 Dichtegradientenzentrifugation	31

3.4.2.1	Zentrifugationsmedium.....	31
3.4.2.2	Präformation eines Dichtegradienten.....	31
3.4.2.3	Fraktionierung des Gradienten	32
3.4.2.4	Dichtebestimmung der oktaedrischen Kristalle.....	32
3.4.3	Nachreinigung	32
3.4.4	Mikroskopische Kontrolle der Kristallaufräinigung	32
3.4.5	Kristallisolierung unter reduzierenden Bedingungen.....	32
3.4.6	Methanolische Extraktion der Pigmente	34
3.4.7	Reduktion der Kristallproben	34
3.4.8	Oxidation der Kristallproben	34
3.5	Spektroskopie.....	34
3.5.1	Kontrollspektren	35
3.5.2	Absorptionsspektren.....	35
3.5.3	Fluoreszenzspektren.....	35
3.5.3.1	Emissionsspektren	36
3.5.3.2	Anregungsspektren	37
3.5.3.3	Differenzspektren	37
3.5.3.4	Polarisationsspektren.....	38
3.5.4	Korrektur von Fluoreszenzspektren	39
3.6	Riboflavin-Bindungsexperimente.....	41
3.6.1	Riboflavin-Bindungsexperimente mit unbehandelten Kristallen.....	41
3.6.2	Bindung unter oxidierenden Bedingungen	42
3.6.3	Bindung unter reduzierenden Bedingungen	42
3.6.4	Riboflavin-Bindungsnachweis mittels differentieller Zentrifugation	42
3.6.5	Kalibriergerade mit definierten Riboflavinkonzentrationen.....	43
3.6.6	Scatchard-Plot-Analyse der Bindungsexperimente.....	44
3.7	Bakterienstämme, Vektor und Phagen.....	44
3.7.1	Bakterienstämme	44
3.7.2	Klonierungsvektor.....	45
3.7.3	Phagen und genomische DNA-Bibliothek	45
3.7.4	Anzucht und Lagerung	45
3.7.4.1	Herstellung der Bakterienmedien	46
3.8	Screening genomischer DNA-Bibliotheken in Phagen.....	46
3.8.1	Herstellung von Plating-cells.....	46
3.8.2	Phagentiterbestimmung.....	46
3.8.3	Ausplattieren der Bibliothek.....	46
3.8.4	Plaquelifts.....	47
3.8.5	Membrantransfer der DNA.....	47
3.8.6	Denaturieren	48
3.8.7	Neutralisieren.....	48
3.8.8	Waschen	48
3.8.9	Immobilisieren der DNA auf der Membran	49
3.8.10	Weitere Screeningrunden	49
3.8.11	Herstellen von Phagenstocks	49
3.9	Nukleinsäure-Präparation	50
3.9.1	Isolierung der DNA aus der genomischen Bibliothek.....	50
3.9.1.1	Amplifikation der Klone mittels Flüssiglysat	50
3.9.1.2	Präparation von DNA aus λ -Phagen.....	51
3.9.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Phycomyces blakesleeana</i>	51
3.9.3	Isolierung von Plasmid-DNA mittels Alkalischer Lyse.....	52
3.9.3.1	Isolierung im kleinen Maßstab aus Übernachtskultur (Minipräparation).....	52

3.9.4	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	53
3.9.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	53
3.9.6	Phenolische DNA-Extraktion	53
3.9.7	Präzipitation von Nukleinsäuren	54
3.9.8	Lagerung von Nukleinsäuren	54
3.10	Elektrophorese von Nukleinsäuren	55
3.10.1	Nicht denaturierende Gelelektrophorese von DNA	55
3.10.1.1	Vorbereiten der DNA-Agarosegele	55
3.10.1.2	Vorbereiten der Proben	56
3.10.1.3	DNA-Größenmarker	56
3.10.2	Denaturierende Gelelektrophorese von RNA	56
3.10.2.1	Schutzmaßnahmen gegen RNasen	56
3.10.2.2	Vorbereiten der RNA-Agarosegele	57
3.10.2.3	Probenvorbereitung	57
3.10.2.4	RNA-Größenmarker	58
3.10.2.5	Durchführung der Elektrophorese	58
3.10.3	Fotografische Dokumentation der Gelelektrophorese	58
3.11	Nukleinsäure-Nachweismethoden	59
3.11.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	59
3.11.2	Ethidiumbromidfärbung von Nukleinsäuren	59
3.11.2.1	DNA-Mengenstandard	60
3.12	Blotting von Nukleinsäuren	60
3.12.1	Southernblot	60
3.12.2	Northernblot	61
3.13	Radioaktive Markierung von Gensonden	62
3.13.1	Markierung durch „endlabeling“	62
3.13.2	Markierung durch „random prime labeling“	63
3.13.3	Entfernung nicht eingebauter Nukleotide	63
3.14	Flüssigszintillationszählung	64
3.14.1	Bestimmung der Inkorporationsrate	64
3.14.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität	65
3.15	Hybridisierung von Nukleinsäuren	65
3.15.1	Hybridisierung von Plaquelifts	65
3.15.2	Waschen der Plaqueliftmembranen	66
3.15.3	Hybridisierung von Southernblots	67
3.15.4	Hybridisierung von Northernblots	67
3.15.4.1	Hybridisierung mit degeneriertem Oligo	68
3.15.4.2	Hybridisierung mit homologer Sonde	68
3.15.5	Waschen der Northernblots	69
3.15.5.1	Blot mit degeneriertem Oligo	69
3.15.5.2	Blot mit homologer Sonde	69
3.15.6	Strippen von Northernblots	69
3.16	Nachweis der Hybridisierungssignale	70
3.17	Klonierung von DNA	70
3.17.1	Restriktion von DNA	70
3.17.1.1	Restriktion von Plasmid-DNA	71
3.17.1.2	Restriktion hochmolekularer genomischer DNA	71
3.17.2	Ligation von DNA	71
3.17.2.1	Linearisieren des Plasmid-Vektors	71
3.17.2.2	Ligation nach Standardbedingungen	72
3.17.2.3	Ligation kurzer kompatibler Enden	73

3.18	Transformation von Bakterien.....	73
3.18.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	73
3.18.2	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....	74
3.18.3	Selektion.....	74
3.18.3.1	Antibiotikaresistenz.....	74
3.18.3.2	Blau-Weiß-Selektion.....	75
3.19	Nukleinsäure-Sequenzierung.....	75
3.19.1	Probenvorbereitung.....	75
3.19.2	Computergestützte Sequenzanalyse.....	75
3.20	Elektrophorese von Proteinen.....	76
3.20.1	Vorbereiten des Gels.....	76
3.20.2	Vorbereiten der Proben.....	78
3.20.3	Durchführung der Elektrophorese.....	78
3.20.4	Fotografische Dokumentation.....	78
3.21	Protein-Nachweismethoden.....	79
3.21.1	Protein-Konzentrationsbestimmung (Amidoschwarz-Methode).....	79
3.21.2	Protein-Konzentrationsbestimmung (CBQCA-Methode).....	80
3.21.3	Coomassiefärbung der Gele.....	81
3.21.4	Silberimprägnierung der Gele.....	81
3.22	Blotting von Proteinen.....	82
3.23	Proteinsequenzierung.....	83
3.23.1	Vorbereiten der Proteine für die Sequenzierung.....	83
3.24	Physiologische Experimente.....	84
3.24.1	Zentrifugation.....	84
3.24.1.1	Kontrollen zur gravitropischen Reizung.....	85
3.24.2	Balancebox.....	85
3.24.2.1	Tonische Bestrahlung.....	86
3.24.2.2	Kontrollen zur tonischen Bestrahlung.....	86
3.24.3	Calcium-Versuche.....	87
3.24.3.1	Inkubation der Sporangiothecen.....	87
3.24.4	Auswertung.....	88
3.24.4.1	Gravitroper Beugungswinkel α	88
3.24.4.2	Längenzunahme Δl	89
3.24.4.3	Statistik.....	90
4	Ergebnisse.....	91
4.1	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	91
4.1.1	Absorption isolierter Kristalle.....	91
4.1.2	Fluoreszenzanregungsspektren der Kristalle von <i>C171</i>	92
4.1.3	Fluoreszenzemissionsspektren der Kristalle von <i>C171</i>	98
4.1.4	Fluoreszenzanregungsspektren der Kristalle vom <i>WT</i>	103
4.1.5	Fluoreszenzemissionsspektren der Kristalle vom <i>WT</i>	111
4.1.6	Methanolische Extraktion der Chromophoren.....	114
4.1.7	Kontrollspektren mit Referenzsubstanzen.....	117
4.1.7.1	Kontrollspektren mit Riboflavin.....	117
4.1.7.2	Kontrollspektren mit L-Monapterin.....	120
4.1.7.3	Kontrollspektren mit NADH.....	121
4.1.8	Kontrollspektren mit Puffer.....	123
4.1.9	Polarisationsspektren.....	125
4.1.10	Korrektur der Anregungsspektren.....	126
4.1.11	Dichtebestimmung der oktaedrischen Kristalle.....	127

4.1.12	Riboflavin-Bindungsexperimente	128
4.1.12.1	Bindungsexperimente mit unbehandelten Kristallen	128
4.1.12.2	Bindungsexperimente in Abhängigkeit vom Redoxzustand	130
4.1.13	Stöchiometrie der am Kristall gebundenen flavinartigen Chromophore	133
4.2	Molekularbiologie	134
4.2.1	Denaturierende SDS-PAGE der oktaedrischen Kristalle	134
4.2.2	AS-Sequenzierung	135
4.2.3	Hybridisierung von Gesamt-DNA	136
4.2.4	Screening der genomischen DNA-Bibliothek	137
4.2.5	Charakterisierung der positiven Klone durch Restriktionsanalyse	138
4.2.6	Hybridisierung der restringierten Klone mit degeneriertem Oligo	139
4.2.7	Kartierung der sequenzierten <i>VFphy55</i> -Region	140
4.2.8	Sequenzvergleiche	142
4.2.9	Northernblotanalyse	143
4.3	Photogravitropische Experimente	145
4.3.1	Einfluss tonischer Bestrahlung auf die Kristallwirkung im Gravitropismus	145
4.3.1.1	Bestrahlung mit 0,5 W/m ²	145
4.3.1.2	Bestrahlung mit 10 ⁻⁸ W/m ²	147
4.3.2	Gravitropische Beugung	149
4.3.3	Längenwachstum	150
4.3.4	Calcium-Versuche	151
4.3.4.1	Längenwachstum	151
4.3.4.1.1	Calcium-Überangebot	152
4.3.4.1.2	Calcium-Mangel	154
4.3.4.2	Gravitrope Beugung	155
4.3.4.2.1	Zugabe von Calcium	155
4.3.4.2.2	Entzug von Calcium	157
5	Diskussion	158
5.1	Fluoreszenzspektroskopie	158
5.1.1	Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der oktaedrischen Kristalle	158
5.1.2	Methanolische Extraktion der Proteinkristalle	169
5.1.3	Flavinbindungsstudien	170
5.2	Stöchiometrische Abschätzungen der Flavinbindung	171
5.3	Dichte der oktaedrischen Proteinkristalle	172
5.4	Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie	173
5.5	Rolle der oktaedrischen Kristalle im Gravitropismus	177
5.6	Einfluss tonischer Bestrahlung auf die Wirkung der Kristalle	179
5.7	Sequenzvergleiche eines Kristallprotein codierenden Gens	180
5.8	Expression eines Kristallgens	182
5.9	Einfluss von Calcium auf die gravitrope Beugung	183
6	Zusammenfassung	186
7	Literatur	188
8	Abbildungsverzeichnis	201
9	Anhang	VIII
	Nukleotidfolge der sequenzierten DNA	VIII
	Medien für die Bakterienkultur	X
	Danksagung	XII
	Lebenslauf	XIII
	Erklärung	XIV

Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
car	Carotinbiosynthese
CBQCA	3-(-4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxyaldehyd
cpm	Zerfälle pro minute (<i>counts per minute</i>)
cry	Cryptochrom
cyt	Cytochrom
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EB	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidiert)
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid (reduziert)
FIH•	Flavosemichinon
FIH ₂	Flavohydrochinon
FMN	Flavinadeninmononukleotid
x g	Beschleunigung
geo	Gravi-/Geotropismus
GIAC	Schwerkraftinduzierte Absorptionsänderung (<i>gravity induced absorbance change</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
i.e.S	im engeren Sinne
IL	Interferenzlinienfilter
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Broth</i>
LIAC	Lichtinduzierte Absorptionsänderung (<i>light induced absorbance change</i>)
M	mol/l
mad	Phototropismus
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
<i>Msp</i> I	<i>Moraxella</i> spec.
MTHF	5,10-Methenyltetrahydrofolat
NTG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
ocp	Oktaedrische Proteinkristalle

OD	optische Dichte
ox	oxidiert
pfu	Plaquebildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuarti</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
red	reduziert
RG	Rotglas
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>SacI</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>
sddH ₂ O	steriles doppelt destilliertes Wasser
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SI-IV	Stadium I-IV
SM	Suspensionsmedium
<i>SpeI</i>	<i>Sphaerotilus natans</i>
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat (<i>sodium sodium citrate</i>)
TAE	Tris Acetat EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
ü.N.	über Nacht
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)
WT	Wildtyp
<i>XbaI</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>badrii</i>
x-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
<i>XhoI</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>

1 Einleitung

Zu den auffälligsten Reaktionen, mit denen Lebewesen auf äußere Reize reagieren, zählen Bewegungen. Im Gegensatz zu vielen niederen Pflanzen sind die höheren und die meisten komplizierter gebauten niederen Pflanzen aufgrund ihrer sessilen Lebensweise nicht in der Lage, als Ganzes ihre Position zu verändern. Ortsfeste Organismen können allerdings durch Wachstumsvorgänge hervorgerufene Lageänderungen von Organen auf veränderte Umgebungsbedingungen reagieren.

1.1 Tropismen

Zu den Mechanismen, die eine Verlagerung einzelner Organe oder Teile des Organismus durch Krümmungsbewegungen hervorrufen, gehören die Tropismen. Diese beispielsweise durch differenzielles Wachstum gegenüberliegender Flanken erfolgten Lageveränderungen werden durch gerichtete Reize induziert und orientiert. Neben anderen Stimuli wird das Wachstum dieser Lebewesen hauptsächlich durch das Schwerfeld der Erde und durch Licht beeinflusst.

1.1.1 Gravitropismus

Viele Lebewesen sind befähigt, ihre Organe durch Krümmungsbewegungen in eine bestimmte Richtung zur Erdbeschleunigung zu bringen (STRASBURGER, 1991). Wachstumsbewegungen, die bezüglich ihrer Richtung durch die Richtung der Erdbeschleunigung bestimmt sind, werden als Gravitropismus bezeichnet (MOHR & SCHOPFER, 1992). Zu unterscheiden sind negativer und positiver Gravitropismus. Gekennzeichnet ist der positive Gravitropismus durch das Wachstum der Organe in Richtung der auf sie einwirkenden Schwerkraft. Beispiele hierfür sind Hauptwurzeln, Rhizoide an Farnprothallien, Moosen und Algen. Negativ gravitrop dagegen verhalten sich u. a. Hauptsprosse, die Fruchtkörper vieler Hutpilze sowie die Sporangioophoren von *Mucor* und *Phycomyces* (LIBBERT, 1987).

1.1.1.1 Statolithen als Gravisuszeptoren

Allgemein akzeptiert ist die Hypothese, dass sogenannte Statolithen als Suszeptoren dienen und durch ihre Verlagerung in die intrazelluläre Weiterleitung des Schwerereizes in höheren Pflanzen involviert sind (VOLKMANN & SIEVERS, 1979, SIEVERS & HENSEL, 1982, BJÖRKMANN, 1988 und SACK, 1997). Dies wird durch physiologische und genetische Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* gestützt, deren Amyloplasten für den Gravitropismus notwendig sind (KISS et al. 1989 und FUKAKI et al. 1998). Gut untersucht sind die Statolithen der Grünalge *Chara foetida*. Ihre Rhizoide enthalten Vesikel mit Bariumsulfatkristallen, deren Verlagerung mit der Interaktion von Actinfilamenten verknüpft ist (SIEVERS et al. 1991 und 1996 und BRAUN & SIEVERS, 1994).

1.1.2 Phototropismus

Licht stellt einen äußerst wichtigen Faktor für die Lebensweise sessiler Organismen dar. Seine Richtung, Intensität, Dauer und spektrale Zusammensetzung sind von erheblicher ökophysiologischer Bedeutung für den Energie- und Stoffhaushalt durch die Photosynthese, die Wirkung auf die Samenkeimung und die Entwicklung der Keimlinge sowie die Regulation der vegetativen und darüber hinaus auch der reproduktiven Entwicklung. Die Lebensweise ist auf den Faktor Licht hin optimiert. Dies bedeutet, dass zur optimalen Ausnutzung des Lichtes und zum Schutz vor schädigender Lichtwirkung sessile Organismen gerichtete Wachstumsbewegungen einzelner Organe durchführen. Beim Phototropismus legt Licht die Richtung der Bewegung fest (MOHR & SCHOPFER, 1992). Analog zum Gravitropismus spricht man auch hier von positivem und negativem Phototropismus.

1.1.2.1 Photorezeptoren

Die Absorption des Lichtes erfolgt durch spezielle Rezeptorsysteme. Neben den im Rot- und Dunkelrotbereich absorbierenden Phytochromen sind die Photorezeptoren zu erwähnen, deren Wirkungsspektrum im UV-A (320-400 nm) und Blau (400-500 nm) liegt. Zu den Photorezeptorsystemen, die an der blaulichtinduzierten Regulation von Bewegungsvorgängen beteiligt sind, gehören die Cryptochrome 1 und 2 (AHMAD & CASHMORE, 1993 und 1996).

und AHMAD et al., 2002) und Phototropine 1 und 2 aus *Arabidopsis thaliana* (CHRISTIE et al., 1998 und 1999) sowie die lichtaktivierte Adenylatzyklase aus *Euglena gracilis* (ISEKI et al., 2002).

1.1.2.2 Cryptochrom / DNA-Photolyase

Die bis heute am intensivsten untersuchten Blaulichtrezeptorsysteme sind die Cryptochrome. Das aus der Photomorphogenesemutante *hy4* (KOORNEEF et al., 1980) von *Arabidopsis thaliana* isolierte Gen (AHMAD & CASHMORE., 1993) zeigte in seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu einer schon bekannten Klasse von DNA-Reperaturenzymen, den bakteriellen Photolyasen, und wurde wegen seiner Photorezeptorfunktion von LIN et al. (1995a) *cry1* genannt. Neben *Arabidopsis thaliana* (AHMAD & CASHMORE., 1993, HOFFMAN et al., 1996, LIN et al., 1996, BRUDLER et al., 2003) konnten aus einer Reihe höherer Pflanzen Cryptochrome charakterisiert werden: Senf (BATSCHAUER, 1993), Tomate (NINU et al., 1999, PEROTTA et al., 2001), Gerste (PEROTTA et al., 2001) und Reis (HIROSE & TAKANO, 2003). Strukturell und funktionell gut untersucht ist die Photolyase von *Escherichia coli* (SANCAR, 2003). Hinweise auf Cryptochrome wurden bei weiteren Bakterien (*Synechocystis*; NG et al., 2003, *Mezorhizobium loti* und *Vibrio cholerae*; WORTHINGTON et al., 2003), dem Pilz *Streptomyces griseus* (KOBAYASHI et al., 1998a), bei *Saccharomyces cerevisiae* (SANCAR, 2003), dem Farn *Adiantum capillus-veneris* (KANEGAE & WADA, 1988), dem Moos *Physcomitrella patens* (IMAIZUMI et al., 2002) und der Grünalge *Chlamidomonas reinhardtii* (SMALL et al., 1995) gefunden. Cryptochrome sind ebenfalls aus *Drosophila* (EMERY et al., 2000), der Maus (KOBAYASHI et al., 1998b), dem Huhn (YAMAMOTO et al., 2001), der Wachtel (FU et al., 2002), dem Zebrafisch (KOBAYASHI et al., 2000) und dem Menschen (HSU et al., 1996 und TODO et al., 1996) näher charakterisiert.

1.1.2.3 Mechanismus und Struktur der DNA-Photolyase von *Escherichia coli*

Anhand der zu den ersten identifizierten Blaulicht-Photorezeptoren gehörenden DNA-Photolyase aus *Escherichia coli* (SANCAR, 2003) sei das Zusammenwirken zweier im Blaulicht absorbierender, an ein Protein gebundener Chromophore (PARK et al., 1995) vorgestellt.

Durch Bestrahlung mit UV-Licht (200-300 nm) verursachte Pyrimidinring-Dimerisierung (Bildung eines Cyclobutanringes zweier benachbarter Thyminbasen) im DNA-Doppelstrang führt zur Blockierung der Replikation und Transkription und hat letale Folgen für die betroffene Zelle.

Die Reparatur durch Photoreaktivierung erfolgt durch UV-A/Blau induzierte Übertragung der Anregungsenergie von MTHF (5,10-Methenyltetrahydrofolat; JOHNSON et al., 1988) auf das essentielle, proteingebundene FADH^- (JORNS et al., 1987 und 1990, CHANDERKAR & JORNS, 1991) via Förstertransfer (PARK et al., 1995 und SCHMIDT, 2000). MTHF fungiert dabei als ein Antennenpigment. Durch Elektronentransfer ermöglicht das angeregte $^*\text{FADH}^-$ die Spaltung des Tymindimers. Replikation und Transkription können nun wieder stattfinden. Über einen Rücktransfer eines Elektrons werden nachfolgend die Chromophoren wieder regeneriert.

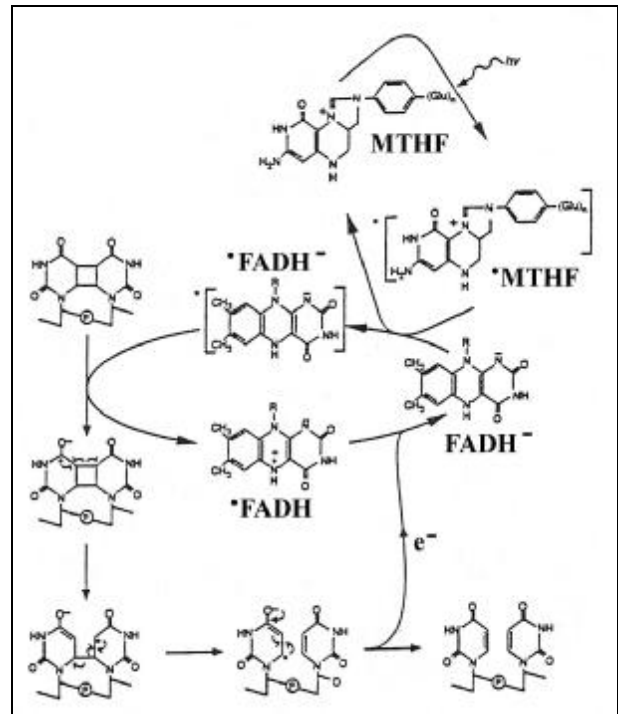


Abb. 1
Mechanismus der DNA-Photolyase aus *Escherichia coli* (verändert nach SANCAR, 1994).

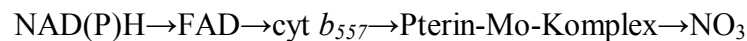
1.1.2.4 Cryptochrome aus *Arabidopsis thaliana*

Ein Beispiel für ein proteingebundenes UV-A / Blau- Photorezeptorsystem mit Flavin und Pterin als Chromophore bei höheren Pflanzen ist Cryptochrom1 aus *Arabidopsis thaliana* (AHMAD & CASHMORE, 1993 und 1996, LIN et al., 1995a) mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zu den DNA-Photolyasen, besonders im Bereich der FAD-Bindedomäne. Cry1 ist an verschiedenen blaulichtabhängigen Prozessen beteiligt, wie Inhibition des Hypokotyllängenwachstums (KOORNEEF et al., 1980 und LISCUM & HANGARTER, 1991), Öffnung des Hypokotylhakens (LISCUM & HANGARTER, 1993), Hypokotylausbreitung (BLUM et al., 1994), der Genexpression der Chalkonsynthese und Chalkonisomerase (AHMAD et al., 1995 und JACKSON & JENKINS, 1995) sowie der Flavonoidbiosynthese (JACKSON & JENKINS, 1995). Besonders Cry2 ist an der Messung der Tageslänge (KOORNEEF et al., 1991 und GUO

et al., 1998) und der Regulation der circadianen Rhythmik (SOMERS et al., 1998 und DEVLIN & KAY, 2000) wie auch am Phototropismus (AHMAD et al., 1998) beteiligt.

1.1.2.5 Nitrat-Reduktase

Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung zweier Chromophoren an einer Redoxkette und als Modell für einen Blaulicht-Photorezeptor ist die in fast allen Pflanzen, Pilzen und Bakterien vorkommende Nitrat-Reduktase (NINNEMANN, 1984), welche die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysiert und in deren aktivem Zentrum an den Fe_4S_4 -Komplex Cytochrom b_{557} gebunden ist. Es enthält auch FAD und mit einem Pterin assoziiertes Molybdän (SIEFERMANN-HARMS et al., 1985), die möglicherweise in einer Elektronentransportkette ihrem Redoxpotential entsprechen miteinander verbunden sind:



Die lichtstimulierte Aktivität der Nitrat-Reduktase äußert sich neben den flavinähnlichen Aktionsspektren beispielsweise in der Beteiligung an der blaulichtinduzierten Konidienbildung bei *Neurospora crassa* (KLEMM & NINNEMANN, 1979) oder der durch Blaulicht reaktivierten, im Dunkeln inaktiven Nitrat-Reduktase bei *Chlamydomonas reinhardtii* (AZUARA & APARICIO, 1983).

1.1.2.6 Primärreaktion

Ergebnisse aus *Arabidopsis thaliana* und Senf (LIN et al., 1995b und MALHOTRA et al., 1995) deuten auf die Kofaktoren FAD und MTHF (MALHOTRA et al., 1995 und LIN, 2000) analog zur DNA-Photolyase aus *Escherichia coli* hin. Der Mechanismus der Primärreaktion der Cryptochrome wird derzeit noch intensiv diskutiert, besonders im Hinblick auf den Redoxzustand der aktiven Form des Kofaktors Flavin. Während es in den meisten Fällen oxidiert vorliegt (LIN et al., 1995b), ist die aktive Form im Falle der DNA-Photolyasen reduziert (LIN, 2000), so auch bei *Vibrio cholerae* (WORTHINGTON et al., 2003). Die phylogenetische Verwandtschaft zu den Photolyasen lässt auch für die Cryptochrome einen ähnlichen Elektronentransfermechanismus für die Primärreaktion möglich erscheinen.

Hinweise auf die Bildung von Flavosemichinon als Teilschritt fanden sich bei *Phycomyces blakesleeanus* (CHEN et al., 1993, GALLAND et al., 1984 und 1989; GALLAND, 1998; SCHMIDT & GALLAND, 1999 und GALLAND & TÖLLE, 2003) und *Arabidopsis thaliana* (LIN et al., 1995). Nach GALLAND & TÖLLE (2003) wird folgendes Modell (Abb. 2) für die photochemische Primärreaktion unter Beteiligung der drei Redoxzustände der Flavine postuliert: Bestrahlung mit UV-A/Blaulicht führt zur Bildung von Flavosemichinon (FlH^\bullet). Dieses wird nach Blau/Rot-Absorption zum Flavohydrochinon (FlH_2) konvertiert, welche seinerseits sowohl im Dunkeln als auch durch Absorption von UV-A beschleunigt zum oxidierten Flavin revertiert wird. Die Absorption von UV-A/Blau einerseits und Blau/Rot andererseits bedingt eine wechselseitige Zu- und Abnahme von Flavin und Flavohydrochinon und bestimmt damit die Reservoirgröße des biologisch

aktiven Flavosemichinon. Die in allen drei Redoxzuständen UV-A absorbierenden Pterine (GALLAND & SENGGER, 1988b) fungieren zur Aufrechterhaltung einer ausgeglichenen Protonen- und Elektronen-Bilanz als Redoxpartner.

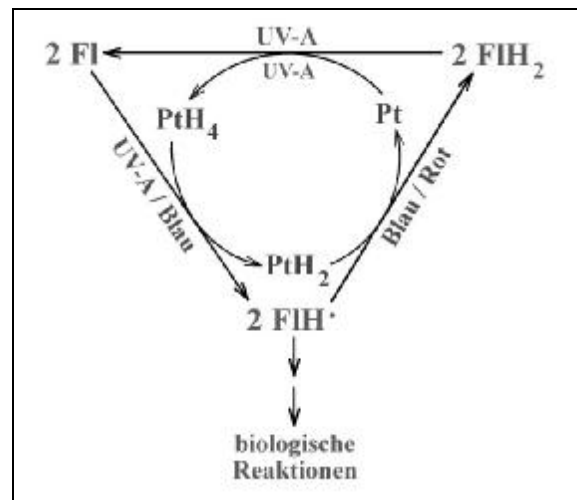
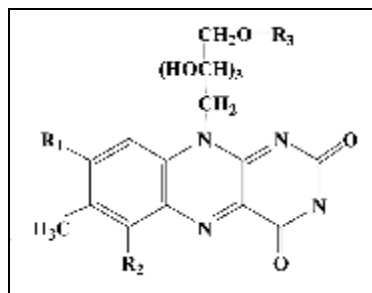


Abb. 2
Modell des Blaulicht-Photorezeptors in *Phycomyces blakesleeanus* (GALLAND & TÖLLE, 2003, verändert).

1.1.2.7 Flavine

Allgemein anerkannt sind Flavine als Photorezeptorpigmente für den UV-A- und Blaubereich (SONG & MOORE, 1974, GALLAND & SENGGER, 1988a, GALLAND, 1992 und HOHL et al., 1992b). Bei den Flavinen handelt es sich um einen tricyclischen, heteroaromatischen Isoalloxazinring mit Methylgruppen an den Positionen 7 und 8 (R_1) sowie einer Ribitylgruppe an Position 10. FMN trägt am Flavin den phosphorylierten Zuckeralkohol Ribitol. FAD dagegen entsteht aus FMN durch Verknüpfung mit AMP (Abb. 3). Die Absorptionseigenschaften der Flavine und damit insbesondere Lage und Höhe der Maxima werden entscheidend von der Art des Derivates, dem umgebenden Medium, dem pH-Wert und dem Oxidationszustand bestimmt (SCHMIDT, 2000). Daraus ergeben sich teilweise große Unterschiede zwischen der reduzierten

und der oxidierten Form, die über das entsprechende Semichinon wechselseitig ineinander überführbar sind (Abb. 4a).



	R ₁	R ₂	R ₃
Riboflavin	CH ₃	H	H
FMN	CH ₃	H	PO ₃ H
FAD	CH ₃	H	PO ₃ AMP

Abb. 3

Strukturformel von Riboflavin und der Derivate FMN und FAD (GALLAND & SENGGER, 1991, verändert).

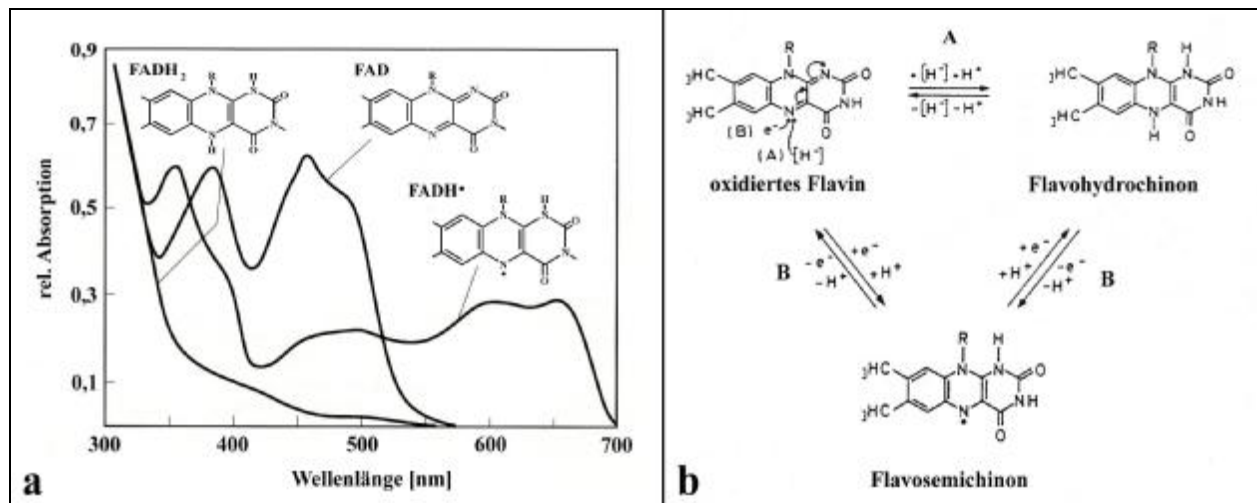


Abb. 4

a) Die Absorptionsspektren der drei Oxidationszustände des Flavinchromophors (SCHMIDT, 2000, verändert) und **b)** deren Interkonversion über einen Zwei-Elektronen-Transfer (A) oder die aufeinander folgende Übertragung je eines Elektrons mit einem Flavosemichinon als Zwischenstufe (B) (GALLAND & SENGGER, 1991, verändert).

Die Reduktion zum Flavohydrochinon kann dabei entweder über den Transfer von zwei Elektronen erfolgen, oder nacheinander durch die Übertragung je eines Elektrons über die Zwischenstufe eines Flavosemichinons stattfinden (Abb. 4b; GALLAND & SENGGER, 1991).

Riboflavin und FMN sind hochfluoreszent (FMN etwa 10 mal stärker als FAD) mit einem Maximum bei 525 nm. Aufgrund eines effektiven „intersystem crossing“, der Energieübertragung vom S₁-Singulett- zum relativ langlebigen T₁-Triplett-Zustand, wodurch Anregungsenergie für photochemische Reaktionen zur Verfügung stehen kann (GALLAND & SENGGER, 1991 und SCHMIDT, 2000).

Neben den schon genannten Prozessen, in denen Flavine involviert sind, ergeben sich aus dem Vergleich von Aktionsspektren verschiedener weiterer Blaulich-Phänomene Hinweise auf die Beteiligung von Flavinen und Flavoproteinen an der Photorezeption im nahen UV und blauen Spektralbereich (PRESTI & GALLAND, 1987), wie beispielsweise Phototropismus von *Phycomyces blakesleeanus*, *Pilobolus kleinii* und *Avena sativa*, Phototaxis von *Euglena gracilis*, lichtstimulierte β -Carotin-Synthese bei *Neurospora crassa*, *Fusarium aquaeductum* und *Myobacterium*, die Chloroplasten-Rückorientierung bei *Funaria*, Stimulation der sexuellen Entwicklung von *Nectria haematococca* oder die Respirationssteigerung von *Chlorella*.

Weitere Befunde deuten neben der Übereinstimmung der spektralen Charakteristika auf die Beteiligung von Flavinen oder Flavoproteinen an der Blaulichrezeption hin.

Nach OTTO et al. (1981) resultieren aus Substitutionsexperimenten mit flavinanalogen Substanzen veränderte Aktionsspektren. Verschiedene Verhaltensmutanten von *Phycomyces blakesleeanus* zeigen spezifische Veränderungen im Flavingehalt (HOHL et al., 1992b).

Lichtinduzierte Absorptionsänderungen in Myzelien von *Phycomyces blakesleeanus* deuten auf die Photoreduktion von Cytochrom b hin und zeigen flavinähnliche Aktionsspektren. Oxidiertes Flavin kann als Photorezeptor dienen und lichtinduziert an einem Elektronentransfer auf den Redoxpartner Cytochrom b beteiligt sein (PRESTI & GALLAND, 1987).

1.1.2.8 Pterine

Aufgrund ihres Absorptionsverhaltens und ihres Redoxpotentials werden neben den Flavinen auch Pterine als UV-A-/Blaulich-Photorezeptorpigmente und geeignete Faktoren in der Blaulichsignaltransduktion diskutiert (GALLAND & SENGHER, 1988b, GALLAND, 1992 und HOHL et al., 1992a). CAMPUZANO et al. (1996) und MARTÍN-ROJAS et al. (1995) diskutierten aufgrund von Versuchen mit Verhaltensmutanten von *Phycomyces blakesleeanus* neben Flavinen weitere Photorezeptoren für das ferne UV. Eine Reihe von Pterinen konnte von KIEWISCH & FUKSHANSKY (1990) fluoreszenzspektroskopisch nach HPLC-Auftrennung von Sporangiphoren-Extrakten aus *Phycomyces blakesleeanus* nachgewiesen werden. Pterinartige Fluoreszenz wurde für den für die Photorezeption notwendigen Paraflagellarkörper von *Euglena gracilis* gezeigt (BRODHUN & HÄDER, 1990, GALLAND et al., 1990, und SCHMIDT et al., 1990). Die DNA-Photolyase von *Escherichia coli* besitzt zur stärkeren Sensibilisierung als zweite Chromophore neben Flavin ein Pterinderivat (WANG et al., 1988).

(JOHNSON et al., 1988, HAMM-ALVAREZ et al., 1990) zeigten für die Photolyase von *Escherichia coli* und Hefe den katalytischen Kofaktor 5,10-Methenyltetrahydrofolat.

Pterine scheinen nach FULLER et al. (1971) an der Kontrolle der Entwicklung des Photosyntheseapparates von *Rhodospirillum rubrum* beteiligt zu sein.

Der Hauptbestandteil der Pterine ist Pteridin (Pyrazino[2,3-d]pyrimidin), das aus einem bicyclischen aromatischen System besteht (Abb. 5).

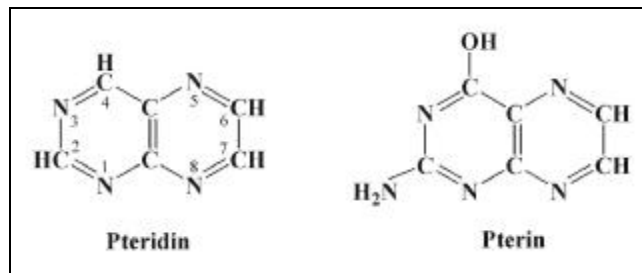


Abb. 5

Strukturformeln von Pteridin und Pterin (nach HOHL, 1992, verändert).

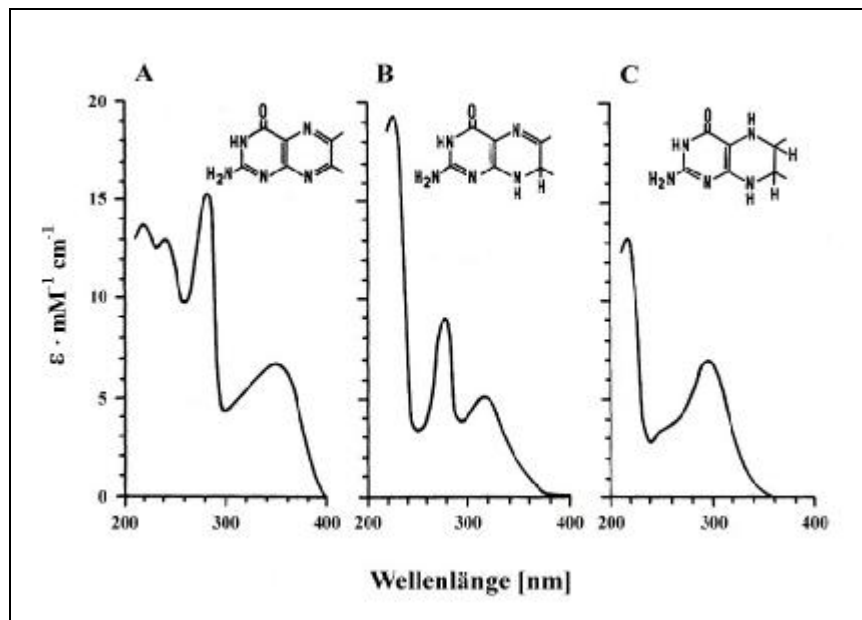


Abb. 6

Absorptionsspektren der drei Oxidationsstufen von 6,7-Dimethylpterin. A: oxidiert; B: Dihydroform; C: Tetrahydroform (nach FULLER aus GALLAND & SENGGER, 1988b, verändert).

Die meisten natürlich vorkommenden Pterine sind 2-Amino-4-hydroxy-pteridine. Durch verschiedene Substituenten an den Positionen 5 und 6 leiten sich daraus unterschiedliche Pterinderivate ab (GALLAND & SENGGER, 1988b). Da Pterine ebenso wie Flavine Radikale bilden können, scheint eine Beteiligung an Elektronentransportprozessen und lichtgesteuerten

Vorgängen möglich. FULLER & NUGENT (1969) konnten die Photoreduktion von Pterinen bei *Rhodospirillum* und *Chromatium* zeigen. Allerdings scheinen in der Natur die Pterine nur in ihrer Dihydro- und Tetrahydroform funktionell zu sein. Das Absorptionsverhalten der Pterine hängt stark vom Redoxzustand ab (Abb. 6). Bathochrome oder hypsochrome Verschiebungen der Absorptionsspektren treten pH-abhängig auf und resultieren aus Veränderungen der Substituenten (GALLAND & SENGER, 1988b, WANG et al., 1988).

1.2 *Phycomyces blakesleeanus*:

Modellorganismus für die Wirkung von UV-A, Blaulicht und anderer Umweltsignale

Der unter den *Eumycota* zu den *Mucorales* zählende Zygomycet *Phycomyces blakesleeanus* (systematische Einordnung 1925 durch HANS BURGEFF) lebt als terrestrischer Saprophyt in feuchten Biotopen, vornehmlich Waldböden nahezu über die gesamte Erde verbreitet (KENDRICK, 1992 und CERDÁ-OLMEDO & LIPSON, 1987). Der Lebenszyklus von *Phycomyces blakesleeanus* ist gegliedert in einen sexuellen, der Neukombination genetischen Materials dienenden Zyklus und einen vegetativen Teil, der durch Bildung von Fruchtkörpern und Sporenproduktion die Vermehrung und Verbreitung gewährleistet (Abb. 7).

Aus den reifen Sporangien, die den Sporangiphoren apikal aufsitzen, werden bei Berührung durch Aufreißen etwa 10^5 mitotisch entstandene Sporen entlassen. Diese keimen und wachsen zu unseptierten Hyphen aus. Durch deren vielfache Verzweigung bildet sich in der Folge ein ausgedehntes Myzel (CERDÁ-OLMEDO & LIPSON, 1987).

Unter Laborbedingungen lässt sich die Keimung durch zehnminütige Hitzeinduktion bei 49,5°C oder Zusatz von Ethansäure im Medium erzielen.

In der sexuellen Phase (Teleomorph) wachsen einzelne Hyphen aus dem Myzel zweier verschiedener Kreuzungstypen (Heterothallie) unter dem Einfluss der von beiden Paarungstypen wechselseitig synthetisierten Trisporäure aufeinander zu (MÜLLER & LOEFFLER, 1992).

Da sich Geschlechter i. e. S. nicht unterscheiden lassen, werden nach BLAKESLEE seit 1904 (+)- und (-)-Kreuzungstypen definiert (CERDÁ-OLMEDO & LIPSON, 1987).

Die als Zygomphore bezeichneten Kontakthyphen wachsen paarweise aus dem Myzel empor und bilden nach einer Übergangsphase als Progametangien durch Kontakt und anschließender Septierung im Apikalbereich das Gametangium. Nach der als Zyogamie bezeichneten und die Klasse der *Zygomycetes* charakterisierenden besonderen Form der Gametangienkopulation (MÜLLER & LOEFFLER, 1992) bildet sich durch das Auswachsen zahlreicher Hüllhyphen die

Zygospore. Während der weiteren Reifung der Zygospore kommt es zur Karyogamie. Lediglich ein diploider Kern bleibt übrig und durchläuft eine Meiose. Nach mehreren Mitosen und mehrmonatiger Dormanz keimt die Zygospore unter geeigneten Bedingungen mit einer Sporangioaphore aus. Diese trägt apikal das Keim-, Primär-, oder Zygosporangium (MÜLLER & LOEFFLER, 1992), das etwa 10^4 Keimsporen entlässt. Diese keimen aus und bilden wiederum ein unseptiertes, coenocytisches Myzel (CERDÁ-OLMEDO & LIPSON, 1987).

Während der vegetativen Phase (Anamorph) wachsen unter geeigneten Bedingungen negativ gravitrop Makrosporangioaphoren aus dem Myzel empor.

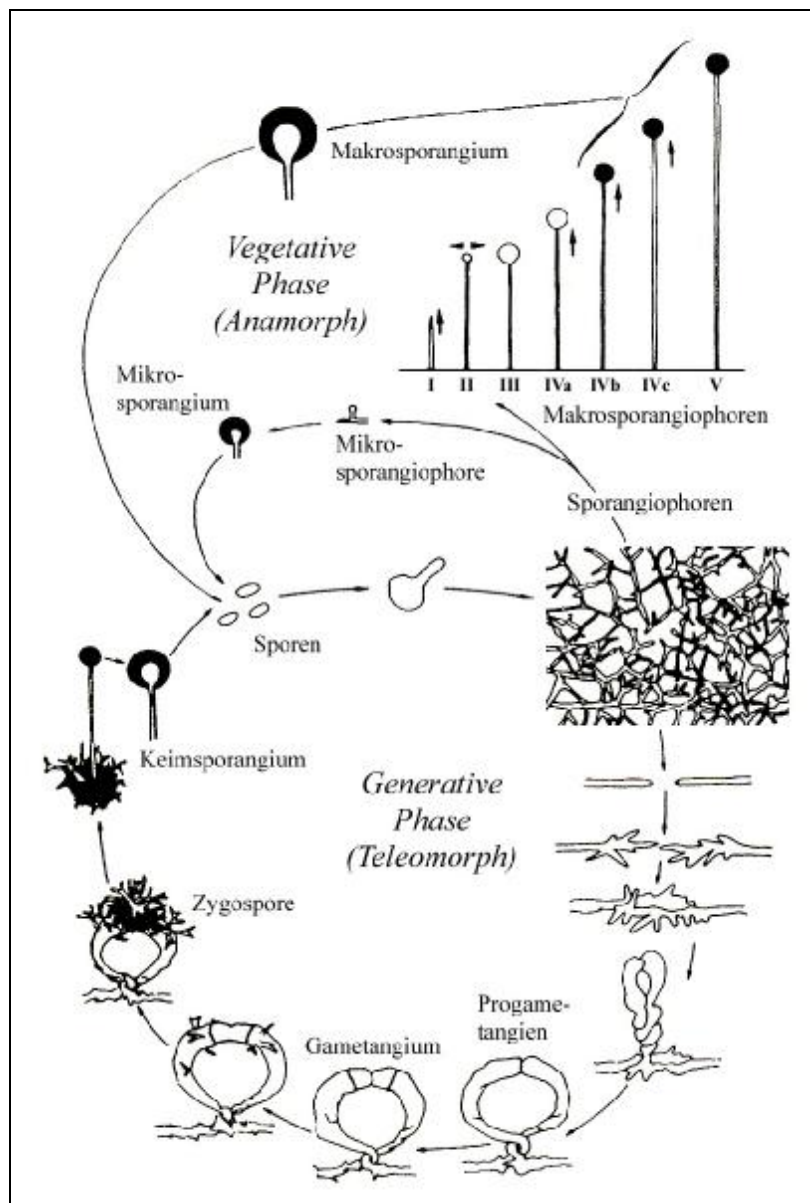


Abb. 7

Der in vegetative (asexuelle) und sexuelle (generative) Phase gegliederte Lebenszyklus von *Phycomyces blakesleanus* (CERDÁ-OLMEDO & LIPSON, 1987, verändert).

Mikrosporangiphoren entstehen dagegen unter Nährstoffmangel oder durch Kälteeinwirkung (THORNTON, 1973), wie auch unterbundenen Gasaustausch oder Überflutung (GUTIÉRREZ-CORONA & CERDÁ-OLMEDO, 1985).

Die Entwicklung der im Folgenden Sporangiphoren genannten Makrosporangiphoren kann in fünf Stadien gegliedert werden (nach CARNOY, 1870 und ERRERA, 1884 in CERDÁ-OLMEDO & LIPSON, 1987):

Sporangiphoren des Stadium *I* sind bis zu 15 mm lang, tragen noch kein Sporangium und sind durch apikales Rotationswachstum im Uhrzeigersinn (in Aufsicht) gekennzeichnet. In Stadium *II* kommt das apikale Wachstum zunächst zum Stillstand und der Apikalbereich beginnt anzuschwellen. Die Entwicklung des zunächst noch gelb gefärbten Sporangiums setzt ein. Sporangiphorenwachstum in radialer Richtung ist in dieser Phase vorherrschend. Eine anschließende etwa zweistündige Ruhephase ohne Wachstum stellt Stadium *III* der Entwicklung dar. Während Stadium *IV* erfolgt in der etwa 2 mm langen, 0,1 mm unterhalb des Sporangiums beginnenden Wachstumszone die interkalare Streckung der Sporangiphore. Abhängig vom Rotationssinn des Sporangienträgers gliedert sich diese Phase in drei Abschnitte, deren erster und letzter (*IVa* und *c*) durch Rotation im Gegenuhrzeigersinn gekennzeichnet sind. In Stadium *IVb* dagegen rotiert die Sporangiphore im Uhrzeigersinn. Parallel färbt sich das Sporangium im Zuge der Reifung dunkler. In Stadium *V* wird die Sporangienentwicklung abgeschlossen. Zunächst noch braun ist es zum Ende schwarz gefärbt. Die Sporenmasse hat sich abgegliedert und zu einzelnen Sporen differenziert. Sporangiphorenwachstum findet zum Schluss keines mehr statt.

Die Länge kann jedoch in den beiden letzten Stadien *IV* und *V* mit über 10 cm beträchtlich anwachsen. Die Sporangiphoren erreichen einen Durchmesser von 100 – 150 µm, die Sporangien etwa 0,5 - 1 mm.

1.2.1 Reaktion auf externe Stimuli

Da die Sporangiphoren von *Phycomyces blakesleeenanus* auf verschiedenste äußere Stimuli sehr sensitiv reagieren, ist dieser Organismus ein geeignetes Objekt zur Untersuchung dieser komplexen Vorgänge (CERDÁ-OLMEDO & LIPSON, 1987):

- Gase (besonders Ethylen) → Veränderung der Wachstumsrate
(Chemotropismus; RUSSO, 1977)

- nahe Barrieren / Gegenstände → Autochemotropismus
(„avoidance response“; CAMPUZANO et al., 1996)
- einseitige Luftströmung → Krümmung in Luftrichtung
(positiver Anemotropismus; COHEN et al., 1975)
- permanente oder transiente
Lichtintensitätsänderung → Licht-Wachstumsreaktion
- Gravitation → Gravitropismus
- einseitige Belichtung → Photo(gravi)tropismus (negativ im UV-B, positiv im UV-A
und sichtbaren Spektralbereich)

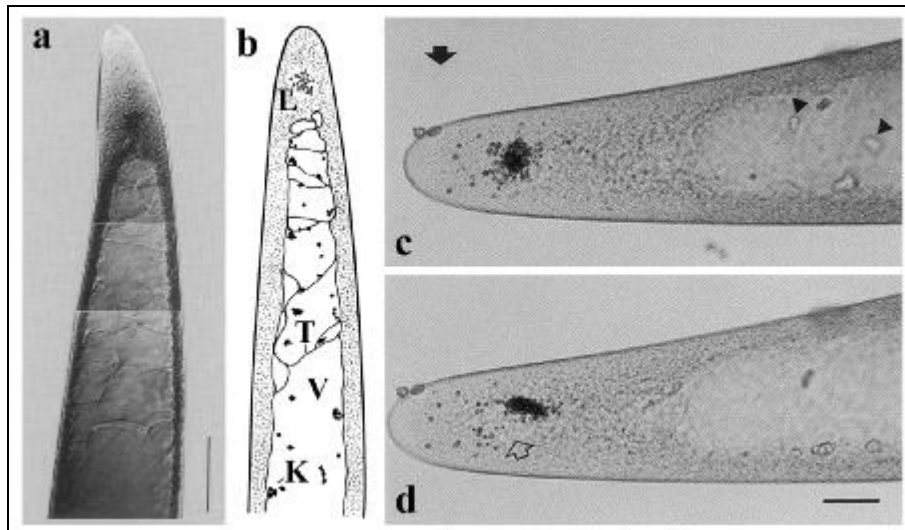
Neben der Adaptation an veränderte Lichtintensitäten zeigen besonders die beiden letztgenannten Reaktionen höherer Pflanzen teilweise bemerkenswerte Übereinstimmungen mit dem Verhalten der Sporangiothecen von *Phycomyces blakesleeana* (GALLAND, 1990). Daher sind Gravitropismus und Phototropismus sowie die Interaktion beider Reaktionen Gegenstand eingehender Untersuchungen.

1.2.1.1 Gravitropismus und Gravisuszeption bei *Phycomyces blakesleeana*

Die für das Pflanzenreich geltende Hypothese, wonach eine intrazelluläre Verlagerung von Statolithen gravitropische Reaktionen hervorruft, wird derzeit für die Pilze intensiv diskutiert. Obwohl gravitropische Bewegungsphänomene auch im Pilzreich vorkommen, konnten den Statolithen ähnliche Organelle zunächst nicht identifiziert werden (KERN & HOCK, 1996).

Die negativen Gravitropismus zeigenden Sporangiothecen von *Phycomyces blakesleeana* (PILET, 1956) wachsen nach horizontaler Ausrichtung nach einer Latenzzeit von 20 min. wieder nach oben und erreichen ihre vertikale Position innerhalb von 10-12 Stunden (DENNISON & SHROPSHIRE, 1984 und OOTAKI et al., 1995). Aufgrund der Verfügbarkeit verschiedener Mutanten eignen sich die Sporangiothecen von *Phycomyces blakesleeana* sehr gut zur Untersuchung der Schwerkraft induzierten Signaltransduktion.

Trotz der bisher noch weitgehend unbekannten Perzeption der Gravitation (DENNISON, 1961 und DENNISON & SHROPSHIRE, 1984) werden drei darin involvierte Mechanismen diskutiert, wie die Reaktion auf die Beugung der Zellwand (Biegungsstress; DENNISON, 1961 und DENNISON & ROTH, 1967) und der Auftrieb eines kugelförmigen Aggregates aus Lipidglobuli im Apikalbereich der Sporangiothece (SCHIMEK et al., 1999a und GROLIG et al., 2003; Abb. 8).

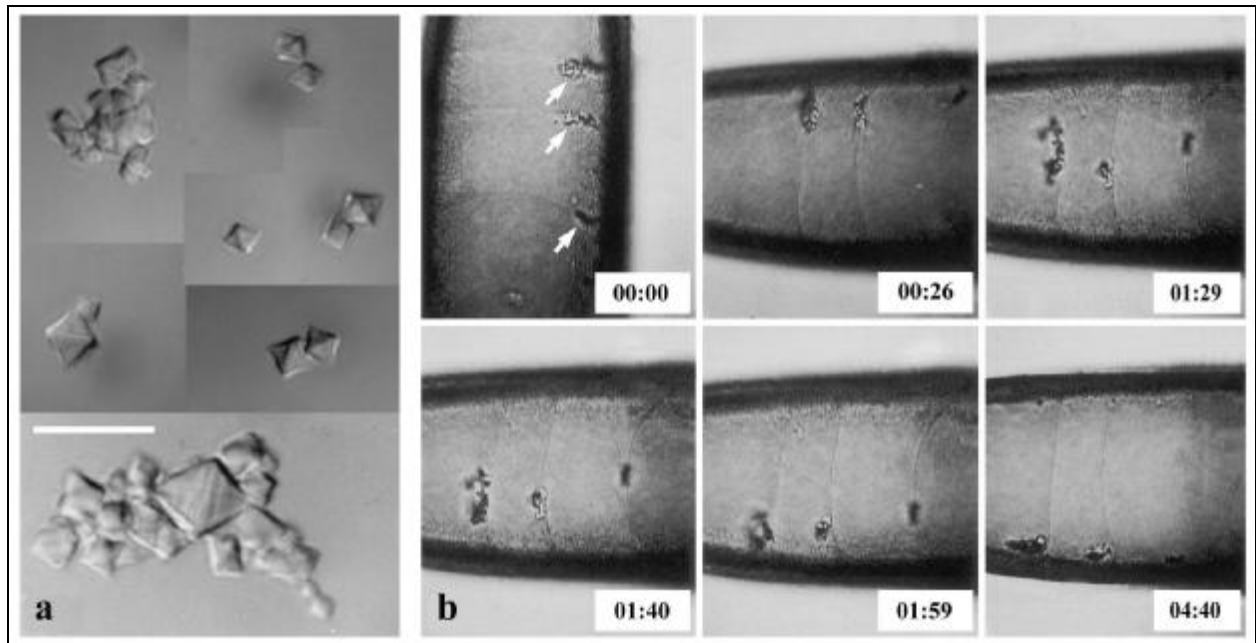
**Abb. 8**

Apikalbereich einer Stadium I-Sporangiophore. a) der kristalllosen Mutante C2 mit den die Vakuole durchziehenden Septen (Balken = 100μm; SCHIMEK et al., 1999a); b) in schematischer Darstellung (L: Lipidglobuli, T: Transseptum, V: Vakuole, K: Kristalle; SCHIMEK et al., 1999b, verändert); c und d) des Wildtyp *NRRL1555* mit auftreibendem Lipidglobuliaggregat und sedimentierenden Kristallen (Pfeile; Balken = 20μm; SCHIMEK et al., 1999a).

Als dritter Reizeingang wird derzeit die Sedimentation vakuolärer parakristalliner Proteinkörper (im Folgenden *Proteinkristalle* oder *Kristalle* genannt) vermutet (SCHIMEK et al., 1999a und b, EIBEL et al., 2000 und FRIES et al. 2002).

Die in der Sporangiohorenvakuole von *Phycomyces blakesleeanus* vorkommenden, bisher aber noch nicht mit der Perzeption der Gravitation zu verknüpfenden oktaedrischen Kristalle (THORNTON, 1968 und 1969, THORNTON & THIMANN, 1964, WOLKEN, 1969 und 1972 und OOTAKI & WOLKEN, 1973) sinken nach Umorientierung der Sporangiohore in die Horizontale mit einer Geschwindigkeit von etwa $100 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ innerhalb von zwei Minuten zur unteren Vakuolenflanke (HORIE et al., 1998, SCHIMEK et al., 1999a und b; Abb. 9).

Die Kristalle mit einem mittleren Volumen von $9,96 \mu\text{m}^3$ und einer Dichte von $1,26 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (EIBEL et al., 2000) werden daher als Statolithen für die Suszeption des Schwerereizes charakterisiert (HORIE et al., 1998, SCHIMEK et al., 1999a und b). Die entlang der die Vakuole durchspannenden Septen sedimentierenden Kristalle scheinen mit diesen assoziiert zu sein (SCHIMEK et al., 1999b). SDS-PAGE zeigt drei Hauptuntereinheiten von 16, 46,5 und 55 kDa, die bei kristalllosen Mutanten nicht auftreten (EIBEL et al., 2000). Sowohl gravisensitive (Klasse I) Phototropismusmutanten (*mad*) als auch im Gravitropismus defekte Mutanten (Klasse II) besitzen oktaedrische Kristalle (EIBEL et al., 2000). Ob die Kristalle ursächlich für die Graviperzeption sind und über die Vermittlung eines Druckreizes reagieren, wird intensiv untersucht und diskutiert.

**Abb. 9**

a) Einzelkristalle und Kristallaggregate; Balken = 10µm **b)** Stadium I-Sporangiophore des Wildtyp *NRRL1555* mit entlang der Transsepten sedimentierenden Kristallen nach horizontaler Ausrichtung (Angaben in min:sec; SCHIMEK et al., 1999a, verändert).

Erste absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Hinweise deuten auf eine Assoziation der Kristalle mit flavin- und pterinartigen Pigmenten hin (EIBEL et al., 2000 und FRIES et al., 2002); diese sind möglicherweise ein essentieller Bestandteil der Kristalle und damit der Signaltransduktion. Nach EIBEL et al. (2000) wird als Folge der Kristallsedimentation eine Neu- oder Umverteilung der chromophoren Gruppen als Schritt in der Reizweiterleitung des Gravitropismus favorisiert. Die Anwesenheit chromophorer Gruppen lässt auch eine zumindest indirekte Beteiligung an der Signaltransduktion des Phototropismus möglich erscheinen. Die Integration beider Signaltransduktionsketten unter Beteiligung der oktaedrischen Kristalle ist derzeit Gegenstand der Diskussion.

1.2.1.2 Interaktion von Phototropismus und Gravitropismus

Die positiv phototropische Krümmung der Sporangiohoren von *Phycomyces blakesleeanus* bei seitlicher Bestrahlung erfolgt nach einer Latenzzeit von 6 min mit etwa $3^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ (RUSSO & GALLAND, 1980 und GALLAND & LIPSON, 1987a). Der große Intensitätsbereich für das phototropische Verhalten von 10^{-9} bis $10 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ (CHEN et al., 1993) ist ein Hinweis für das Vorhandensein mindestens zweier Photorezeptoren (GALLAND & LIPSON, 1987 und VARJÚ et al., 1961). Die variierende Höhe des UV-A-Maximums in phototropischen Balance-

Experimenten mit Licht verschiedener Intensitäten der Referenzwellenlänge von 450 nm (GALLAND & LIPSON, 1985a) deuten in die gleiche Richtung, wie auch die Befunde von GALLAND & LIPSON (1987), wonach Aktionsspektren für die Beugungsrate der Sporangiphoren im Vergleich zu niedrigeren Intensitäten im Hochintensitätsbereich ein stärkeres UV-A-Maximum zeigen.

Aktionsspektren des Phototropismus (GALLAND, 1983, GALLAND & LIPSON, 1985a und ENSMINGER et al., 1990) deuten im Vergleich zu denen höherer Pflanzen (SHROPSHIRE & WITHROW, 1958, BASKIN & INO, 1987 und GALLAND & SENER, 1991) auf eine Übereinstimmung der beteiligten Pigmentklassen (PRESTI & GALLAND, 1987). Die UV-A/Blaulichtrezeption in *Phycomyces blakesleeanus* scheint durch Flavoproteine ähnlich den Cryptochromen stattzufinden (GALLAND, 1990).

Der bisherigen Klassifizierung der im Phototropismus veränderten *mad*-Mutanten in Klasse I (Defekt auf Rezeptorebene oder in frühen Schritten der Signaltransduktion) und Klasse II (Störung am Ende der Signaltransduktion mit fehlendem negativem Gravitropismus, oder Autochemotropismus; BERGMAN et al., 1973) wird von CAMPUZANO et al. (1996) die Hypothese entgegengesetzt, wonach sich die Schädigung der untersuchten Mutanten auf Photorezeptorebene befindet. Der Phototropismus der Klasse II-Mutanten wird im Gegensatz zur Klasse I zusätzlich im UV-A gestört, im fernen UV dagegen weniger. Zusammen mit Aktionsspektren für den Photogravitropismus deutet dies auf eine Signalintegration auf Ebene des UV-A/Blau-Photorezeptors hin (CAMPUZANO et al., 1996).

Mutantenanalysen zeigen eine Stimulation des Gravitropismus durch bilaterale UV-A- oder Blaulicht-Bestrahlung, unabhängig vom Vorhandensein der oktaedrischen Kristalle (GROLIG et al., 2000). Im wellenlängenabhängigen photogravitropischen Gleichgewicht (VARJÚ et al., 1961, LÖSER & SCHÄFER, 1986, GALLAND, 1983 und GALLAND & LIPSON, 1985b) steigt nach GALLAND et al. (2001) die Bestrahlungsstärke von einseitig appliziertem Blaulicht zur Kompensation des Gravitropismus exponentiell mit dem Sinus des Inklinationswinkels der Sporangiphoren. Andererseits sinkt die Kompensations-Bestrahlungsstärke bei Fehlen der Kristalle (GALLAND et al., 2001).

Gleichzeitige Applikation von Licht und Schwerereizen induziert im Bereich der Sporangiphoren-Wachstumszone Absorptionsänderungen, die sich von jenen unterscheiden, die jeweils nach Einzelstimulierung mit Licht (LIACs; „light induced absorbance changes“; SCHMIDT & GALLAND, 1999) oder Gravitation (GIACs; „gravity induced absorbance changes“) hervorgerufen werden können (SCHMIDT & GALLAND, 2000). LIACs deuten dabei auf Flavosemichinone hin (SCHMIDT & GALLAND, 1999), während GIACs die

Reduktion von Cytochromen vermuten lassen (SCHMIDT & GALLAND, 2000). Hierdurch werden Beobachtungen gestützt, wonach Licht und Schwerereize interagieren (DENNISON, 1964).

Derzeit wird für die Verknüpfung der Signaltransduktionswege des Phototropismus und des Gravitropismus von SCHMIDT & GALLAND (2000) folgendes Modell vorgeschlagen:

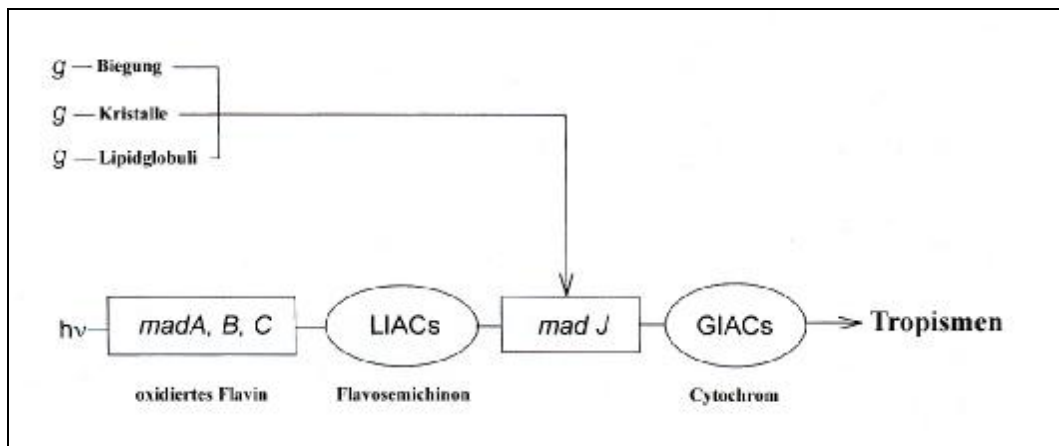


Abb. 10

Modell der Interaktion der Signaltransduktionsketten von Phototropismus und Gravitropismus (SCHMIDT & GALLAND, 2000, verändert).

Licht wirkt über die Genprodukte der Gene *mad A, B, C*, während Schwerereize (vermittelt durch die Reizeingänge Biegungsstress, Kristallsedimentation und Lipidglobulienauftrieb) die Signaltransduktion über das Genprodukt von *mad J* beeinflussen. Untersuchungen an der *madJ*-Mutante *A909* von *Phycomyces blakesleeenanus* mit abnormalen GIAC-LIACs implizieren, dass LIACs und GIACs jeweils spezifisch für die Signaltransduktionsketten von Phototropismus und Gravitropismus sind und dass deren Interaktion auf der Ebene des *madJ*-Genproduktes stattfindet (SCHMIDT & GALLAND, 2000).

2 Zielsetzung

Die zentrale Vakuole der Sporangiphoren des Wildtyp *NRRL1555* und vieler Verhaltensmutanten von *Phycomyces blakesleeanus* enthält oktaedrische Proteinkristalle, die zunächst von THORNTON (1969) und ZALOKAR (1969), später aber näher durch OOTAKI & WOLKEN (1973) untersucht und beschrieben wurden. An die möglicherweise als Statolithen fungierenden Kristalle (HORIE et al., 1998, SCHIMEK et al., 1999a und b) scheinen im Falle des Wildtyps flavin- und pterinartige chromophore Gruppen assoziiert zu sein (EIBEL, 1997 und EIBEL et al., 2000).

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der oktaedrischen Kristalle in der Signaltransduktionskette des Photogravitropismus näher zu untersuchen.

Dabei sollte auch untersucht werden, ob bezüglich ihrer molekularen Zusammensetzung und Struktur sowie ihrer Funktion Ähnlichkeiten zu dem UV-A/Blaulicht-Photorezeptor Cryptochrom bestehen.

Ob an die Proteinkristalle flavin- und pterinartige Pigmente gebunden sind und wie diese Chromophorenbindung beschaffen ist, sollte anhand fluoreszenzspektroskopischer Untersuchungen (insbesondere durch Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie) sowie durch Bindungsstudien näher geklärt werden.

Versuchsreihen zum gravitropischen Beugungsverhalten mit isogenen Kristall- und Kristallmangel-Mutanten sollten zur näheren Charakterisierung der Funktion der Kristalle beitragen.

Darüber hinaus sollte molekularbiologisch mit Beginn der Klonierung des kristallproteincodierenden Gens und mit dessen Sequenzuntersuchung eine genauere Funktionsbeschreibung der Kristallproteine im Mechanismus der Signaltransduktion ermöglicht werden.

Ergänzend dienten erste Expressionsstudien dazu, Hinweise auf die zeitliche und räumliche Verteilung der Kristallproteine, auch unter Berücksichtigung des Einflusses bestimmter Lichtqualitäten, während der Morphogenese der Sporangiphoren zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Neben den von Merck, Darmstadt und Roth, Karlsruhe bezogenen Chemikalien der Qualität p.a. wurden verwendet:

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Albumin Fraktion V	Serva, Heidelberg
[α - 32 P]dATP ¹	HARTMANN Analytic, Braunschweig
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit, USA
baker's yeast tRNA	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Fluka, Buchs, Schweiz
BSA	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Butanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Casamino acids	Difco Lab., Detroit, USA
Chloroform	Fluka, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DNase I	Boehringer, Mannheim
Entwickler (GBX developer and replenisher)	Kodak, Rochester, USA
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs, Schweiz
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Fixierer (GBX fixer and replenisher)	Kodak, Rochester, USA
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
[γ - 32 P]dATP ¹	HARTMANN Analytic, Braunschweig
Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haen, Seelze
λ -DNA	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
lambdaDNA-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
L-Monapterin	Dr. Schirck, Jona, Schweiz
Low melting Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Mangan(II)-sulfat	Riedel-de Haen, Seelze
Methylen-bis-Acrylamid	Sigma, Deisenhofen
MOPS	USB Amersham, Cleveland, USA
Na ₂ -EDTA	Fluka, Buchs, Schweiz
Na ₂ -Molybdat	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumacetat	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumborat	Serva, Heidelberg

Natriumdithionit	Serva, Heidelberg
N-Lauroylsarcosin	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumpyrophosphat	Sigma, Deissenhofen
Nycodenz	Nycomed Pharma
PIPES	Sigma, Deissenhofen
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
PVP löslich	Serva, Heidelberg
Quicksafe A	Zinsser-Analytic, Frankfurt
Riboflavin	Sigma, Deissenhofen
RNase A	Boehringer, Mannheim
Saccharose	Sigma, Deissenhofen
SDS	USB, Cleveland, USA
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
Serva Blue R	Serva, Heidelberg
Shrimp Alkaline Phosphatase	Amersham, Cleveland, USA
T4DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4Polynucleotid Kinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TEMED	Serva, Heidelberg
Thiamin	Sigma, Deissenhofen
Trichloressigsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Trizol	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Trypton	Difco Lab., Detroit, USA
Zinksulfat	Riedel-de Haen, Seelze

1) spez. Aktivität 3000Ci/mmol, stabilisiert in 10 mM Tris·HCl, 2 mM DTT

3.2 Geräte

Schüttler

- Gyratory Shaker G2 (New Brunswick Scientific, Edison, USA)
- Modell TC-7 (New Brunswick Scientific, Edison, USA)
- IKA Vibrax-VXR (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)
- Vortex IKA VF2 (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)
- BioDancer (New Brunswick Scientific, Edison, USA)

Zentrifugen

- Ultrazentrifuge T-1080 mit Rotoren TFT 41.14 und Rotor TFT 70.38 (Kontron Instruments, Mailand, Italien)
- Beckman-Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotor JA14 (Beckman Instruments; München)
- Biofuge 22R mit Festwinkelrotor HFA 28.1 und Ausschwingrotor HSA 4.100 (Heraeus Sepatech, Hanau)
- MIKRO 12-24 (Hettich, Tuttlingen)
- Sorvall Kühlzentrifuge RC5 mit Rotor SS-34 (DuPont de Nemours Deutschland, Bad Homburg)

Inkubatoren

- Controlled Environment Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Edison, USA)
- Brutschrank BT5042E (Heraeus, Hanau)
- Heizblock BT1302 (Haep Labor Consult, Bovenden)

Wasserbäder

- Schüttelwasserbad #1083 (GFL, Burgwedel)
- Wasserbad #1007 (GFL, Burgwedel)
- Wasserbad W13 mit Einhängethermostat D1 (Haake, Karlsruhe)
- Wasserbad F10 / HC (Julabo, Seelbach)

Waagen

- Feinwaage Handy H51 (Sartorius, Göttingen)
- # 1209 MP (Sartorius, Göttingen)
- # 2254 (Sartorius, Göttingen)

Photometer

- Zweistrahlphotometer UV3000 (SHIMADZU, Kyoto, Japan)
mit Software Spectrafile-UVplus (Heyden & Son, Köln) .
- Einstrahlphotometer UV-1202 (Shimadzu Europa, Duisburg)
- Fluoreszenzspektralphotometer RF-5000 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
mit Software HyperRF 1.57 (LabControl, Köln)

Elektrophorese

- Wide Mini Sub Cell GT mit Spannungsquelle Powerpac 300 (BioRad, München)
- Elektrophoreseapparatur mit Minigelausrüstung (8,5x8x1mm) (Biometra, Göttingen) und Spannungsquelle E321 (Consort; Turnhout, Belgien)

Fotografische Dokumentation

- CCD-Videokamera XC77CE (Sony, Japan)
mit Computer Monitor und Drucker Video Copy Prozessor P99E (Mitsubishi, Tokyo, Japan)
- Video-Gel-Dokumentationssystem Gel Doc 1000 (BioRad, München)
- Spiegelreflexkamera X300S (Minolta, Osaka, Japan)
mit Farbfilter Gelborange multicoated und Rotorange multicoated (B+W, Bad Kreuznach)
- Film Agfapan APX 25 oder Agfaortho25 (Agfa-Gevaert, Leverkusen)
- Fotopapier Ilford RC Deluxe (Ilford Imaging, Knutsford Cheshire, England)
- Leuchtschirm (REX Messinstrumentebau, Erlangen)
- Belichtungseinrichtung Focomat Ic (Leitz, Wetzlar)

Diverse Geräte

- Photodiode (Messkopf BN-9102-4; Gigahertz-Optik, Puchheim)
mit Mikrovoltmeter (P-9201; Gigahertz-Optik, Puchheim)
- Diaprojektor (Leitz Prado Universal; Leitz, Wetzlar) mit Osram-Halogen Lampe Belaphot 24V/250W
- Parafilm ,M' Laboratory Film (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA)
- Tankblot-Anlage (Eigenbau der Instituts-Werkstatt)
- Schlauchpumpe (Desaga, Heidelberg)
- Gradientenmischer (Eigenbau der Instituts-Werkstatt)
- Refraktometer # 110698 (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Inverses Lichtmikroskop IM 35 (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Mikrowellengerät Privileg 8020 (Quelle, Fürth)
- Trockenschrank (Heraeus, Hanau)
- pH-Meter 2001 pH (Sentron, Roden, NL)
- beheizbarer Magnetrührer IKA Combimag RCT (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)
- Autoradiografiekassetten verschiedener Größen Hypercassette (Amersham Bioscience Europa, Freiburg)
- Autoradiografie-Film BioMax MS
und Intensifying screen BioMax MS Screen (KODAK, Rochester, USA)
- Kontaminationsmonitor LB1210 B (Berthold, Bad Wildbad)
- Mini-Zählrohr Serie 900 (Mini-Instruments, Maldon, UK)
- Hybridisierungsöfen MINI 10 (Hybaid, Asford, UK)
- Hybridisierungsröhren (Schott, Mainz)
- Flüssigszintillationsdetektor Liquid Scintillation Analyzer LS 6500 (Beckman Instruments, München)
- Quarz-Suprasil Ultra-Mikro-Küvetten 105.253-QS 100µl (Hellma, Müllheim)
- Quarz-Suprasil Halb-Mikro-Küvetten 104-QS 1400µl (Hellma, Müllheim)
- UV-Schirm TF-20 M (Vilbert Lourmat, Marne la Vallee, Frankreich)
- Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (SCI Science Services, München)
- Ultrazentrifugenröhrchen (Nalge-Nunc, Rochester, USA)
- Polyamidgewebe Monodur Mon PES 10 ST und 30 ST (Verseidag Techfab, Geldern-Walbeck)

3.3 Pilzmaterial

Für bestimmte Fragestellungen war es notwendig, einzelne Bereiche des Thallus von *Phycomyces blakesleeanus*, wie Myzel oder Sporangioophoren einerseits, oder auch verschiedene Entwicklungsstadien der Sporangioophoren andererseits, getrennt voneinander zu untersuchen. Die Anzuchtmethoden des Pilzmaterials, dessen Aufarbeitung und die Isolierung verschiedener Zellbestandteile beschreiben die folgenden Abschnitte.

3.3.1 Verwendete Stämme

Neben dem Wildtypstamm *NRRL 1555* (-) (Bergman et.al., 1973) von *Phycomyces blakesleeanus* fanden die in der folgenden Tabelle genannten Mutanten Verwendung.

Stamm	Bezeichnung in dieser Arbeit	Genotyp	Herkunft und Mutagen	Referenz
NRRL 1555	<i>WT</i>	(-)	Wildtyp	Bergman et al., 1973
C 171	<i>C 171</i>	<i>carA30 carR21</i> (-)	C 9, NTG	Ootaki et al., 1973
MR 14	<i>MR 14</i>	<i>carA5</i> (-)	A56(+) × C2(-)	Meier, 2001
MR 18	<i>MR 18</i>	<i>carA5 ocp-1</i> (-)	A56(+) × C2(-)	Meier, 2001
MR 74	<i>MR 74</i>	<i>ocp-1</i> (-)	A56(+) × C2(-)	Meier, 2001
MR 77	<i>MR 77</i>	(-)	A56(+) × C2(-)	Meier, 2001

Tab. 1

Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Phycomyces blakesleeanus* mit ihrem Genotyp und ihrem Kreuzungs- bzw. Mutagenisierungsursprung.

3.3.1.1 Genetische Bezeichnung

Die genetische Bezeichnung der Stämme von *Phycomyces blakesleeanus* (Verzeichnis der *Phycomyces*-Stämme, OOTAKI & MIYAZAKI, 1993) basiert auf der Nomenklatur von DEMEREC et al.(1966)

mad abnormaler Phototropismus
geo abnormaler Gravitropismus
car abnormale Carotinbiosynthese
ocp Vorhandensein oktaedrischer Proteinkristalle (MEIER, 2001)
 (-)/(+) Paarungstyp

3.3.1.2 Mutagenisierung

Die Mutagenisierung durch Behandlung mit NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin) (GICHNER und VELIMINSKY, 1982 und RONCERO et al., 1984) der in obenstehender Tabelle genannten Ausgangsstämme führte zur Bildung der in der ersten Spalte bezeichneten Mutanten.

3.3.1.3 Kreuzung

Nicht durch NTG-Behandlung entstandene Mutanten wurden durch Kreuzung o.g. Ausgangsstämme von MEIER (2001) erhalten.

3.3.2 Anzucht

Für die Anzucht von *Phycomyces blakesleeenanus* waren konstante Bedingungen zum Inokulieren des Mediums unerlässlich. Dazu mussten die Sporen der verschiedenen Stämme in gleichbleibender Qualität und Quantität als Stamm-Suspensionen vorgehalten werden.

3.3.2.1 Herstellen der Sporensuspension

Entweder wurden auf Saugpapier dauergelagerte Sporen in 1 ml sddH₂O suspendiert oder bei -20°C eingefrorene Stamm-Suspensionen 1:10⁴ verdünnt. Nach Keiminduktion durch 10minütige Hitzebehandlung bei 49,5°C im Wasserbad wurden auf 3-4 mit SIV-Medium gefüllte Kunststoff-Petrischalen (92 mm Ø; Sarstedt, Nümbrecht) je 100 µl der Suspension ausplattiert. Die Petrischalen wurden in transparenten Kunststoffkisten (340 x 220 x 90 mm; Kobe-Laborbedarf, Marburg) bei 21°C unter moderatem Weißlicht (0,7 W/m²; Osram L 40 W/19 Tageslicht 5000 de Luxe) gelagert. Von den nach einigen Tagen gewachsenen Sporangiphoren wurde ein Sporangium mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in 1 ml sddH₂O suspendiert und 1:100 verdünnt. Erneut wurden, wie oben beschrieben, aus der entstandenen Suspension SIV-Platten beimpft und die Sporangiphoren bis zur Reife (4-5 Tage) angezogen. Die Sporen dieser Anzucht wurden allesamt in 5 ml sddH₂O durch Abstreifen der Sporangiphoren über den Petrischalenrand suspendiert. Diese Stamm-Suspension wurde in einem sterilen Reagenzglas mit locker schließender Aluminiumkappe im Kühlschrank gelagert. Um eine gleichbleibende Wachstumsdichte der Sporangiphoren zu gewährleisten, war es unerlässlich, etwa alle 4 Wochen den Lebendtitel der Sporenstammsuspensionen zu bestimmen, um bei dessen Veränderung die Konzentration der Impfsuspension entsprechend korrigieren zu können. Definierte Volumina der Stammsuspension wurden daher wiederum auf SIV-Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden konnte die Konzentration der keimfähigen Sporen ermittelt werden.

3.3.2.2 Kulturmedien

a) SIV-Festmedium (SUTTER, 1975)

20	g	D(+)-Glucose-Monohydrat
2	g	L-Asparagin · H ₂ O
5	g	KH ₂ PO ₄
30	g	Bacto Agar
0,5	g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
2	ml	CaCl ₂ (0,1 M)
1	ml	Thiamin · HCl (0,1%)
0,1	ml	Spurenelement-Lösung (siehe b)
ad 1 l aq. demin.		

b) Spurenelement-Lösung

2	g	Citrat · H ₂ O
1,5	g	Fe(NO ₃) ₃ · 9 H ₂ O
1	g	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O
0,3	g	MnSO ₄ · H ₂ O
0,05	g	CuSO ₄ · 5 H ₂ O
0,05	g	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O
ad 0,1 l aq. demin.		

c) SIV-Flüssigmedium

Die Rezeptur für das SIV-Flüssigmedium entspricht der Zusammensetzung des Festmediums, jedoch ohne Bacto Agar.

Das Medium wurde autoklaviert, in entsprechende Gefäße gefüllt, bzw. im Falle des Flüssigmediums vor dem Sterilisieren bereits aliquotiert und nach dem Abkühlen im Kühlschrank gelagert.

3.3.2.3 Wachstums- und Anzuchtbedingungen

Die mit der geeigneten Sporenkonzentration beimpften Medien wurden, wenn nicht näher beschrieben, bis zum Erreichen des gewünschten Entwicklungsstadiums mehrere Tage bei 21°C unter moderatem Weißlicht (0,7 W/m²; Osram L 40 W/19 Tageslicht 5000 de Luxe) gelagert.

3.3.2.4 Petrischalenkultur

3.3.2.4.1 Stadium-I-Sporangiophoren

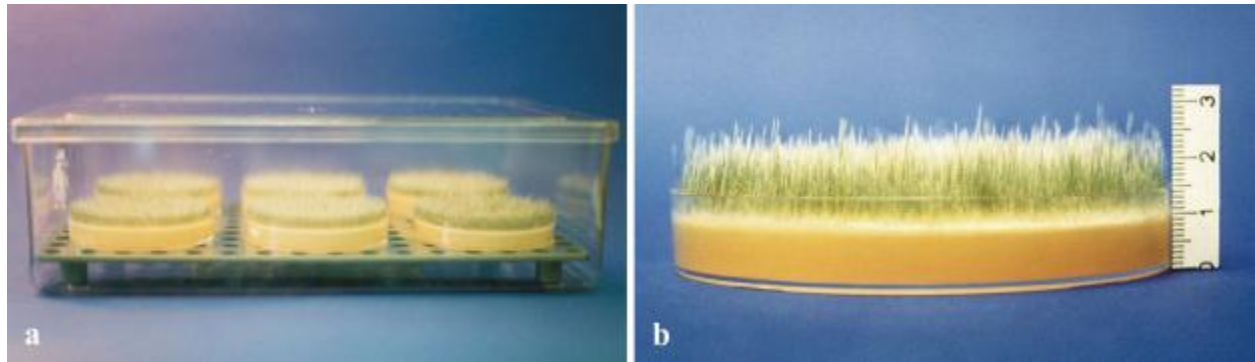


Abb. 11

Stadium-I-Sporangiophoren der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus*.

a) Anordnung der Petrischalen in der Anzuchtbox; b) erntereife Sporangiophoren.

Um für die Isolierung von oktaedrischen Kristallen aus *Phycomyces blakesleeanus* in ausreichender Menge Sporangiophoren zu erhalten, wurden je 100 µl einer 1:10⁴-Verdünnung der jeweiligen Sporenstammessuspension auf SIV-Medium gefüllte Kunststoff-Petrischalen ausplattiert. Jeweils sechs solcher Platten wurden in transparente Kunststoffkisten gestellt. Zum Erreichen eines feuchten Milieus wurden die Kisten mit 150-200 ml Wasser befüllt und die Deckel der Kunststoffkisten durch eine doppelte Lage Parafilm verschlossen. Ein Rost verhinderte das Überfluten der Platten. Durch diese Maßnahmen konnte gewährleistet werden, dass sich nur sehr wenige Stadium-IV-Sporangiophoren entwickelten (EIBEL,1997). Die weitere Anzucht erfolgte wie unter 3.3.2.3 beschrieben.

3.3.2.4.2 Myzel und Stadium-I-Sporangiophoren für Expressionsstudien

Alle Inokulationsarbeiten wurden im Sicherheitslicht (rote Leuchtstoffröhre TL 40W/15, Philips, Holland) durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen durch am Myzel anhaftenden Agar in der nachfolgenden Aufarbeitung wurde auf die SIV-Agarplatte eine sterile nicht hydrophobierte Nitrocellulosemembran (0,2µm Porenweite; Sartorius, Göttingen) aufgelegt und die Sporen (200µl einer 1:10⁴-Verdünnung) nach der Hitzeinduktion darauf ausplattiert. Die glatte Oberfläche der Membran diente einem leichten Entfernen des gesamten zusammenhängenden Myzels. Die Inokulation der Agarplatten für Sporangiophorenwachstum erfolgte wie in Abschn. 3.3.2.4.1. Alle Platten wurden, lediglich mit ihrem Deckel verschlossen,

in lichtdichte, schwarze Kisten verbracht. Die Einzelkammern der Kisten waren oberseits mit Blau- bzw. Rotglas-Einsätzen für verschiedene Lichtbedingungen ausgerüstet. Dunkelkontrollen wurden in absolut lichtdichten, schwarzen Kisten angezogen. Die Anzucht erfolgte unter den Standard-Lichtbänken (siehe 3.3.2.3).

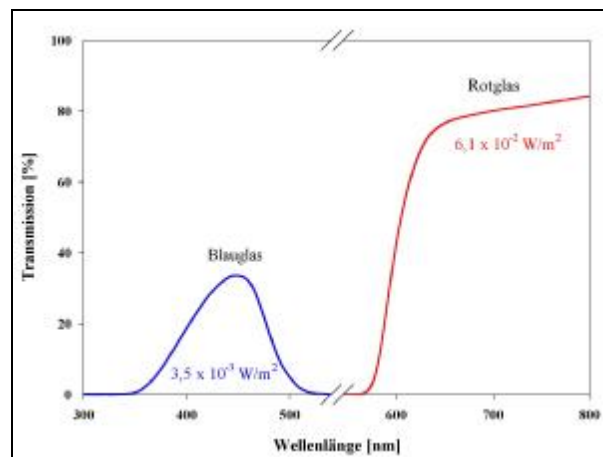


Abb. 12

Darstellung der Transmissionsbereiche der für die Anzucht von Myzel und Sporangiphoren der Expressionsanalysen verwendeten Farbgläser mit den daraus resultierenden Bestrahlungsstärken.

3.3.2.4.3 Einzelsporangiphoren



Abb. 13

Vial mit Stadium-IVb-Sporangiphore.

Einzelsporangiphoren mussten für die Versuchsdauer von *in-vivo*-Experimenten in ihren Anzuchtgefäßen verbleiben. Hierzu waren sogenannte Vials, mit SIV-Medium gefüllte Flachbodengläser (10 mm Ø x 40 mm; Münsterstädter Glaswarenfabrik, Münsterstadt) geeignet. Diese wurden mit jeweils 25 µl einer 1:10⁶-Verdünnung der jeweiligen Sporen-Stammsuspension inokuliert. In entsprechende Ständer aufgenommen, konnten die Vials in den o.g. transparenten Kisten angezogen werden. Im Unterschied zur Anzucht von ganzen Platten wurden die Transparentboxen nicht zusätzlich mit Parafilm verschlossen. Erst nach Ausbilden des Myzels wurde etwas Wasser zugegeben und der Kistendeckel leicht geöffnet. Für die physiologischen Experimente wurden ausschließlich einzelne Sporangiphoren des Stadiums IVb verwendet.

3.3.2.5 Myzel-Flüssigkultur

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus *Phycomyces blakesleeanus* erforderte die Anzucht von Myzel in Flüssigkultur. Mit je 100 µl einer 1:10-Verdünnung der Sporenstammsuspension wurden jeweils 50 ml SIV-Flüssigmedium angeimpft. Die Anzucht erfolgte über 40-42 Stunden in 250 ml-Erlenmeyerkolben auf einem Horizontalschüttler bei etwa 200 U/min im 21°C-Kulturraum.

3.3.3 Erntemethoden

Die Bereitstellung des Ausgangsmaterials für die unterschiedlichen Fragestellungen erforderte besondere Verfahren, um die verschiedenen Pilzbestandteile zu ernten.

3.3.3.1 Sporangiphoren aus Petrischalenkultur

Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen war es nicht immer möglich, Sporangiphorenrasen einheitlichen Entwicklungsstadiums zu erhalten. Einzelne zu früh und zu schnell gewachsene Sporangienträger wurden zunächst von Hand mit einer Pinzette entfernt, bevor die Petrischalen für einige Augenblicke kopfüber in flüssigen Stickstoff getaucht wurden. Die schockgefrorenen Sporangiphoren konnten sehr einfach mit einem leicht abgewinkelten, vorgekühlten Spatel von der Platte rasiert, sofort in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermörsert und in handelsüblichen Kleinbildfilmdöschen bei -20°C aufbewahrt werden.

3.3.3.2 Myzel aus Petrischalenkultur

Das Myzel ließ sich sehr leicht mit einer Pinzette am Rand aufnehmen und dann als geschlossener, zusammenhängender Rasen abziehen. Anschließend wurde es mittels Saugpapier weitestgehend von anhaftender Feuchtigkeit befreit und in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermörsert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -20°C.

3.3.3.3 Einzelsporangiophoren

Für *in-vivo*-Untersuchungen von Einzelsporangiophoren wurden bis auf eine alle weiteren Sporangiohoren mittels einer Pinzette von den Vials entfernt. Der verbliebene Sporangienträger konnte dann im Vial sofort im Experiment verwendet werden.

3.3.3.4 Myzel aus Flüssigkultur

Zur vollständigen Befreiung des Myzels von anhaftendem Medium wurde dieses über eine mit Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) belegte Nutsche abgesaugt. Nach mehrmaligem Nachspülen mit ddH₂O und anschließendem Trockensaugen war das Myzel zur Weiterverwendung vorbereitet oder konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

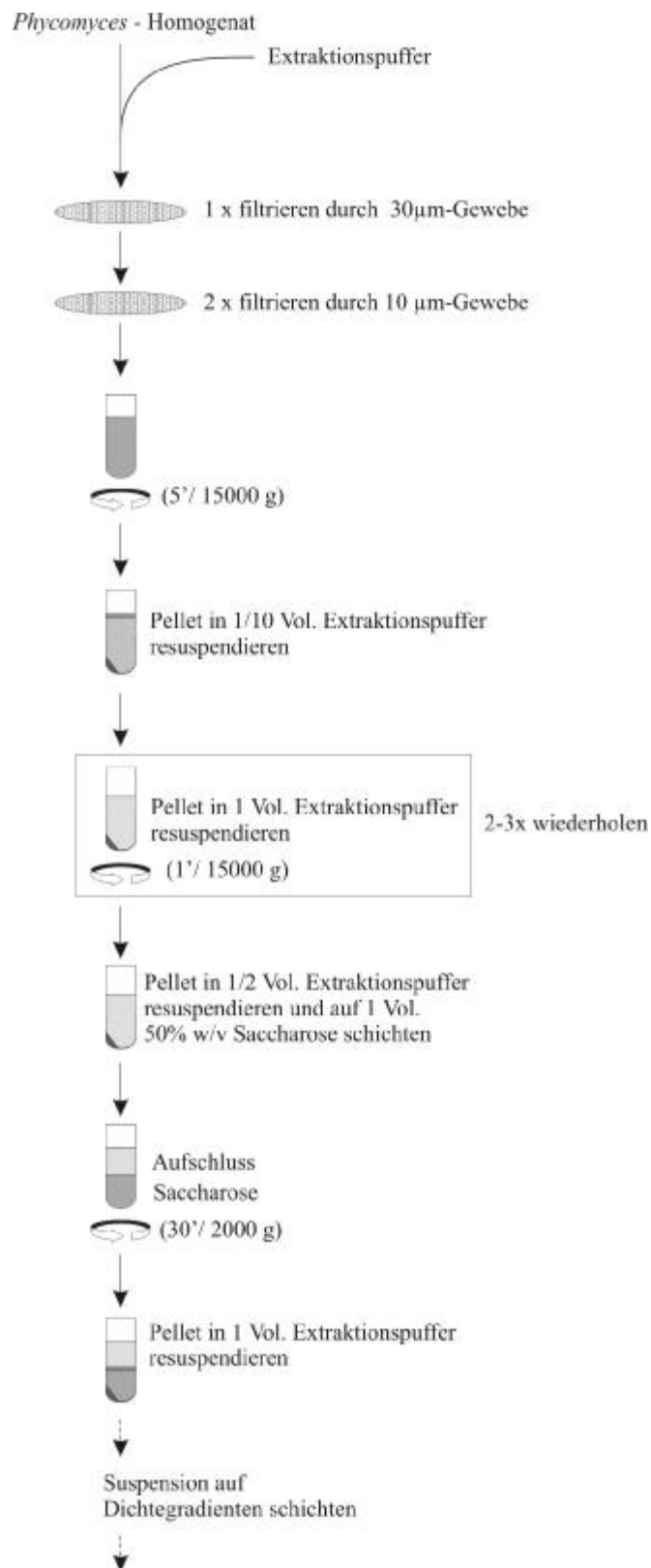
3.4 Kristallisierung

3.4.1 Vorreinigung

Die *Phycomyces*-Sporangiophoren wurden in einer an die Methode von OOTAKI & WOLKEN (1973) angelehnten Weise für die Isolierung der oktaedrischen Kristalle behandelt.

Die Aufarbeitung erfolgte weitestgehend auf Eis, während die Zentrifugationen bei 4°C durchgeführt wurden. Das folgende Schema soll den Ablauf der Isolierung der oktaedrischen Kristalle aus *Phycomyces blakesleeanus* verdeutlichen. Der in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermörserte Inhalt eines Filmdöschens wurde mit 10 ml Extraktionspuffer versetzt und unter Rühren aufgetaut. Zur Entfernung von Zellwandbruchstücken schlossen sich Filtrationsschritte durch Polyamidgewebe mit 30 und 10 µm Maschenweite an. Der Rohextrakt wurde nun in mehreren Zentrifugations- und Waschschrten zunächst 10:1 und dann nochmals 2:1 eingeeengt, um anschließend auf ein gleiches Volumen 50% (w/v) Saccharose geschichtet einer differentiellen Zentrifugation unterzogen zu werden. Das Pellet wurde nun in Extraktionspuffer resuspendiert und der Überstand verworfen.

Extraktionspuffer	0,1	M	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
	0,1	M	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
	0,03	%	NaN ₃
	→		pH 6,8

**Abb. 14**

Darstellung des Ablaufs der Vorreinigung der oktaedrischen Kristalle aus *Phycomyces blakesleeana*.

3.4.2 Dichtegradientenzentrifugation

Zur weiteren Reinigung erfolgte im nächsten Schritt eine Dichtegradientenzentrifugation über 4h bei 4°C und 100000 x g, anhand derer die oktaedrischen Kristalle aufgrund ihrer Dichte von anderen Zellbestandteilen getrennt werden konnten.

3.4.2.1 Zentrifugationsmedium

Als Medium für die Dichtegradientenzentrifugation diente Nycodenz, ein N,N'-Bis(2,3-dihydroxypropyl)5-[N-(2,3-dihydroxypropyl)acetamidol]2,4,6-triiodo-isophthalamid mit einer spezifischen Dichte von 2,1 g/ml (Nycomed Pharma; Oslo, Norwegen). Dieser jodierte Kohlenwasserstoff ist inert, nicht-toxisch und eignet sich daher zu Ausbildung stabiler Dichtegradienten. Durch die nicht-ionische Eigenschaft zeigt er keine Wechselwirkungen mit dem Zentrifugationsgut. Die vielen hydrophilen Gruppen bewirken eine sehr gute Wasserlöslichkeit. Er konnte daher auch gut in Extraktionspuffer gelöst werden. Aufgrund des Absorptionsmaximums bei 244 nm erwies er sich als unproblematisch für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen im Wellenlängenbereich oberhalb von 300 nm.

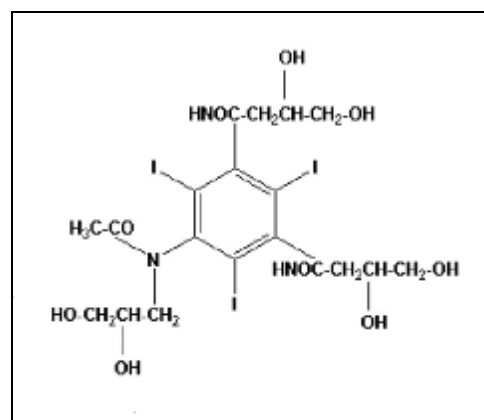


Abb. 15
Strukturformel von Nycodenz.

3.4.2.2 Präformation eines Dichtegradienten

Da die Dichte der oktaedrischen Kristalle bei etwa 1,26 g/cm³ liegt (EIBEL et al., 2000, FRIES et al., 2002), wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers durch sukzessives Zumischen einer 65%igen (w/v) Nycodenzlösung zu einer 25%igen Lösung ein Dichtegradient von 1,13 bis 1,35 g/cm³ präformiert.

3.4.2.3 Fraktionierung des Gradienten

Nach Beendigung des Zentrifugenlaufs wurde der Gradient von oben her mit einer Pipette sehr vorsichtig in 500µl-Fractionen zerlegt.

3.4.2.4 Dichtebestimmung der oktaedrischen Kristalle

Zur Dichtebestimmung der oktaedrischen Proteinkristalle wurden 15 µl der zu untersuchenden Gradientenfraction auf die Optik eines Refraktometers gegeben und auf einer Skala der Refraktionsindex abgelesen. Die Dichte errechnete sich aus folgender Formel (Produktinformation Nycodenz):

Gl. 1: Dichte [g/cm³] = 3,242 x η – 3,323 (η = Refraktionsindex)

3.4.3 Nachreinigung

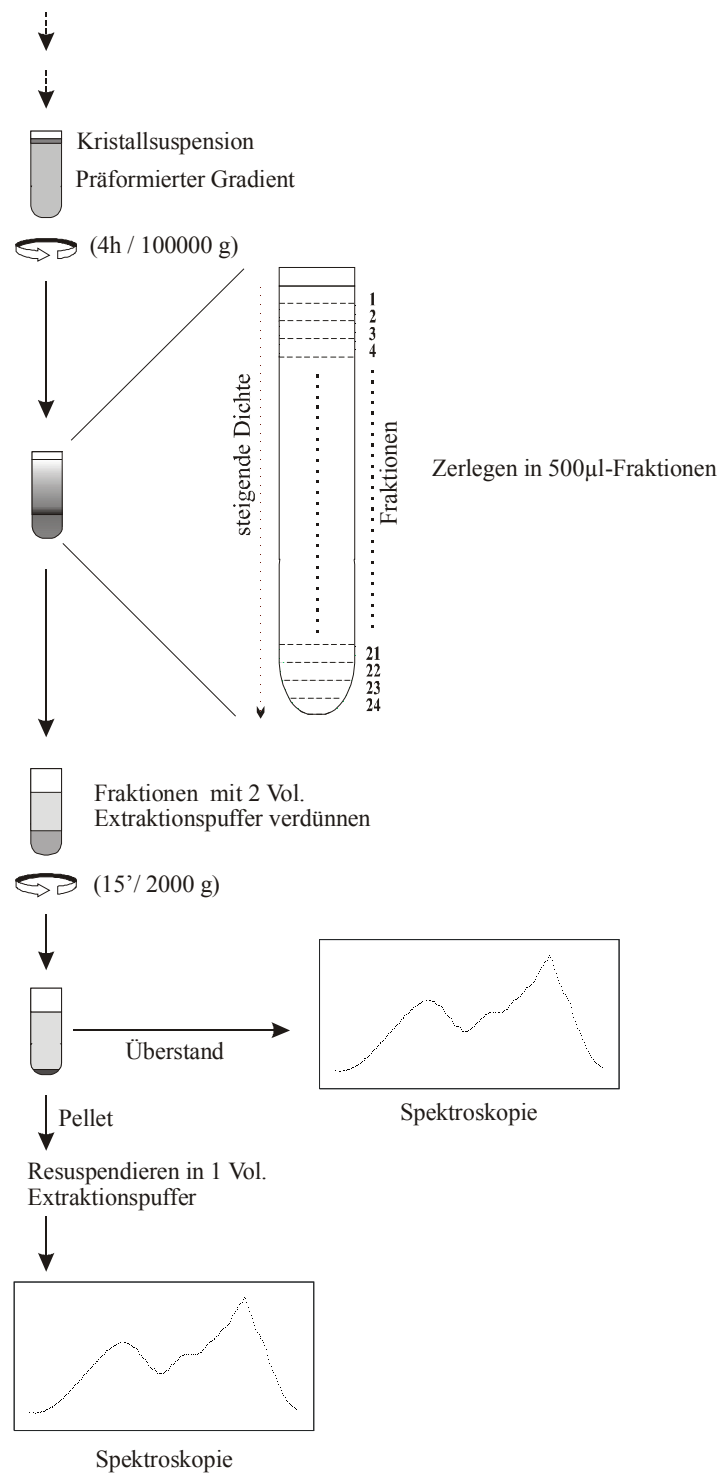
Abb. 16 (S. 33) illustriert die weitere Aufarbeitung der Kristallproben. Die Gradientenfractionen wurden mit Extraktionspuffer 1:3 verdünnt, 15 min bei 4°C und 2000 x g pelletiert und in frischem Extraktionspuffer resuspendiert, um möglichen Interaktionen zwischen verbliebenem Nycodenz und Reduktions- oder Oxidationsmitteln bei der späteren Behandlung der Proben vorzubeugen.

3.4.4 Mikroskopische Kontrolle der Kristallaufreinigung

Während des Extraktionsprozesses konnte mit Hilfe eines Lichtmikroskopes der Reinigungserfolg überprüft werden.

3.4.5 Kristallisolierung unter reduzierenden Bedingungen

Um während der Aufreinigung die oktaedrischen Kristalle weitgehend vor Oxidation zu schützen, wurde allen Medien Dithiotreitol bis zu einer Endkonzentration von 8 mM zugesetzt.

**Abb. 16**

Ablauf der Nachreinigung oktaedrischer Kristalle aus *Phycomyces blakesleeanaus*.

3.4.6 Methanolische Extraktion der Pigmente

Für die Extraktion der chromophoren Gruppen wurden die isolierten oktaedrischen Kristalle mehrfach methanolisch bei jeweils höherer Temperatur extrahiert. 1,5 ml Kristallsuspension wurden mit 0,5 ml Methanol versetzt und 15 min bei zunächst 40°C extrahiert. Nach 15 min Zentrifugation mit 5000 x g bei RT wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 0,5 ml Methanol nun bei 50°C wiederum 15 min extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation schloss sich eine dritte Extraktion bei 65°C an. Die Extraktionsüberstände wurden vereinigt und konnten spektroskopisch vermessen werden.

3.4.7 Reduktion der Kristallproben

Zur Reduktion der oktaedrischen Kristalle wurde den Proben jeweils frisch angesetztes Natriumdithionit bis zu einer Endkonzentration von $2 \times 10^{-4}\text{M}$ zugesetzt. Da Natriumdithionit selber leicht oxidiert wird, wurde die Stammlösung mit Stickstoff begast.

3.4.8 Oxidation der Kristallproben

Durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat bis zu einer Endkonzentration von $5 \times 10^{-5}\text{M}$ konnten die oktaedrischen Kristalle oxidiert werden.

3.5 Spektroskopie

Zur Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften von isolierten Kristallen aus *Phycomyces blakesleeanus* wurden Absorptionsspektren und darüber hinaus zur näheren Charakterisierung Fluoreszenzspektren aufgenommen.

3.5.1 Kontrollspektren

Alle Chemikalien und Puffer, die bei den spektroskopischen Untersuchungen der oktaedrischen Kristalle Verwendung fanden, wurden zur Überprüfung auf Fluoreszenz, Absorption und mögliche Artefakte einzeln, sowie in allen möglichen Kombinationen mindestens in der im Experiment eingesetzten Konzentration im Fluoreszenzspektroskop und Photometer mittels Differenzspektrenbildung untersucht.

3.5.2 Absorptionsspektren

Alle Absorptionsspektren wurden mit einem Zweistrahlphotometer aufgenommen. Dies gestattete das Erzeugen von Differenzspektren. Da der Wellenlängenbereich der Absorptionsspektren bis in das nahe UV hineinreichte, wurden UV-durchlässige Quarz-Küvetten ($d=1\text{cm}$) verwendet.

3.5.3 Fluoreszenzspektren

Die Eigenschaften vieler Substanzen, nach Bestrahlung mit Licht, besonders aus dem energiereichen UV-Bereich, spezifisch Licht in Form von Fluoreszenz zu emittieren, macht man sich in der Fluorimetrie zu Nutze. Die Fluoreszenz ist die Folge der Rückkehr eines Moleküls aus einem angeregten Energiezustand in seinen Grundzustand. Durch Einstrahlung von energiereichem Licht werden Moleküle aus dem Grundzustand auf ein höheres (energiereicheres) Niveau gehoben. Die Relaxation von einem höheren Niveau erfolgt zum ersten Singulettzustand (S_1 -Zustand) strahlungslos. Die Rückkehr vom S_1 -Niveau in den elektronischen Grundzustand (S_0) dagegen kann in Form von Energietransfer auf andere Moleküle, in Form chemischer Reaktionen, durch internen Energietransfer innerhalb eines Moleküls oder aber durch Fluoreszenz stattfinden. Fluoreszenzlicht ist daher immer energieärmer als das zuvor eingestrahlte Licht; die Emission erfolgt mit größeren Wellenlängen als die Anregung. Da jede Substanz charakteristische Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren besitzt, lässt sie sich mittels fluoreszenzspektroskopischer Analysen identifizieren und charakterisieren. Emissionsspektren zeichnen sich durch das Vorhandensein nur eines Maximums aus. Mehrere Maxima lassen daher auf ein Substanzgemisch schließen. So

ist z.B. die Identifikation einzelner Komponenten aus einem Stoffgemisch möglich. Darüber hinaus erlauben Fluoreszenzspektren Aussagen über Redoxzustände, Bindungseigenschaften und energetische Verhältnisse. Die Untersuchungen wurden mit einem Fluoreszenzspektralphotometer durchgeführt, dessen prinzipieller Aufbau in Abb. 17 dargestellt ist. Die Auswertungssoftware ermöglichte das weitere Bearbeiten der Rohdaten. Das Fluoreszenzspektralphotometer besteht in seinem Grundaufbau aus einem Anregungs- und einem Emissionsstrahlengang. Durch ein Anregungs- oder Excitationsgitter erzeugtes monochromatisches Anregungslicht wird über Spiegel auf die Messküvette gelenkt und das von dort emittierte Fluoreszenzlicht, wiederum über Spiegel weitergeleitet, von einem Photomultiplier detektiert. Excitations- und Emissionsgitter erlauben es, die jeweiligen Wellenlängen zu verändern. Man spricht dementsprechend auch von einem Anregungs- oder Emissionsspektrum.

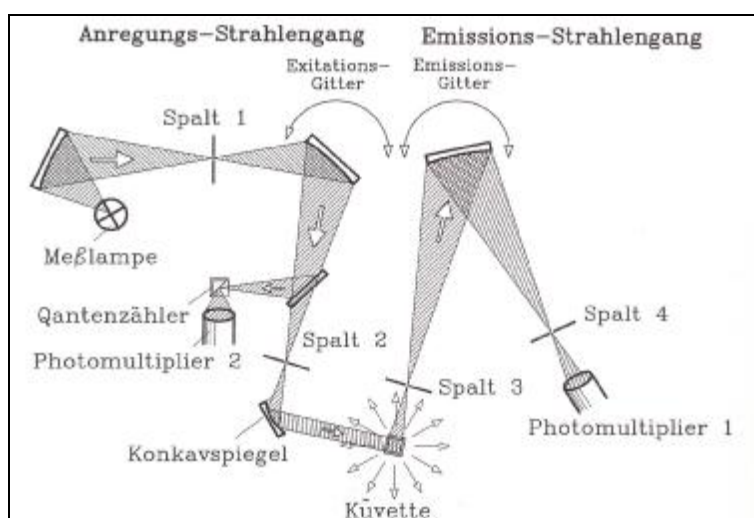


Abb. 17

Prinzipieller Aufbau eines Fluorometers mit Anregungs- (Excitations-) und Emissionsstrahlengang. Ein Teil des Anregungslichts wird zu Korrekturzwecken des Lampenrauschens abgezweigt. (SCHMIDT, 2000).

3.5.3.1 Emissionsspektren

Entsprechend ihrer Absorptionsmaxima zeigen Moleküle oder Substanzen bei definierten Wellenlängen maximale Anregbarkeit. Zur Aufnahme von Fluoreszenz-Emissionsspektren werden eben diese Wellenlängen fest eingestellt und die Emissionswellenlängen variiert, sodass ein Emissionsspektrum resultiert.

3.5.3.2 Anregungsspektren

Die Ermittlung eines Anregungsspektrums einer Probe geschieht in umgekehrter Weise wie bei der Detektion eines Emissionsspektrums. Jetzt wird die zuvor ermittelte Maximumwellenlänge des Emissionsspektrums fest vorgewählt und die Wellenlänge des Anregungslichtes verändert, woraus ein Spektrum resultiert, das die Wellenlängen der größten Anregbarkeit angibt.

3.5.3.3 Differenzspektren

Differenzspektren beschreiben die Fluoreszenzänderung nach einer Veränderung des Redoxzustandes einer Substanz, wie z. B. nach Oxidation oder Reduktion. Sie erlauben, einzelne Substanzen aufgrund ihres Verhaltens durch solche Behandlungen innerhalb eines Gemisches näher zu charakterisieren.

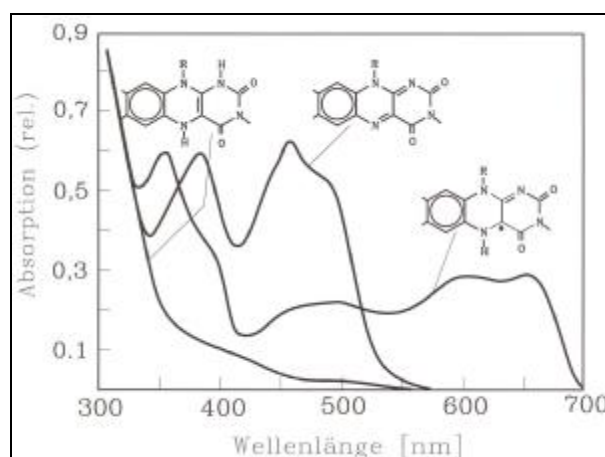


Abb. 18

Die Absorptionsspektren der drei Oxidationszustände des Flavinchromophors (von links): reduziert, oxidiert und radikalisch (SCHMIDT, 2000, verändert).

Anhand der obigen Abbildung wird deutlich, wie sich die Absorptionseigenschaften von Flavin in Abhängigkeit von dessen Oxidationszustand ändern. Da Absorptions- und Anregungsspektren identisch sind (SCHMIDT, 2000), gilt dies auch für die Fluoreszenz. Die Kristallproben wurden wie in Abschn. 3.4.7 u. 3.4.8 erläutert, mit Reduktions- und Oxidationsmittel behandelt. Aus den Rohspektren der reduzierten, teilreduzierten und oxidierten Kristalle konnten mit Hilfe der Auswertungs-Software die entsprechenden Fluoreszenzdifferenzspektren nach den Gleichungen 2-4 generiert werden.

Gl. 2: $\text{Probe}_{(\text{teilreduziert})} - \text{Probe}_{(\text{reduziert})} = \text{Differenzspektrum}_1 \text{ („DTT-red“)}$

Gl. 3: $\text{Probe}_{(\text{oxidiert})} - \text{Probe}_{(\text{teilreduziert})} = \text{Differenzspektrum}_2 \text{ („ox-DTT“)}$

Gl. 4: $\text{Probe}_{(\text{oxidiert})} - \text{Probe}_{(\text{reduziert})} = \text{Differenzspektrum}_3 \text{ („ox-red“)}$

3.5.3.4 Polarisationspektren

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie sind Aussagen darüber möglich, ob ein fluoreszierendes Molekül - ein Chromophor - gelöst oder an eine Matrix, wie z.B. ein Protein, gebunden vorliegt. Weiter können durch diese Methode Hinweise auf Energieübertragung zwischen benachbarten Chromophoren oder Reaktionspartnern gewonnen werden. Fluoreszenzlicht kann physikalisch als eine transversale Dipolstrahlung betrachtet werden. Diese hat in Bezug auf ein emittierendes Molekül eine definierte Richtung. Wird linear polarisiertes Licht auf eine Probe mit gelösten und isotrop verteilten Fluorophoren eingestrahlt, so resultiert daraus mehr oder weniger polarisiertes Fluoreszenzlicht (SCHMIDT, 2000). Die Polarisation ist abhängig vom Winkel, den die Schwingungsebene des elektrischen Feldvektors (E-Vektor) des Anregungslichtes zum Übergangsdipolmoment des emittierenden Moleküls bildet. Liegen E-Vektor und Übergangsdipolmoment parallel zueinander, ergibt sich für die Polarisation p_0 nach SCHMIDT (2000) der Maximalwert $\frac{1}{2}$. Sind E-Vektor und Übergangsdipolmoment jedoch senkrecht zueinander orientiert, resultiert der Minimalwert $-\frac{1}{3}$. Die folgende Abbildung illustriert den Verlauf eines idealisierten Polarisationspektrums.

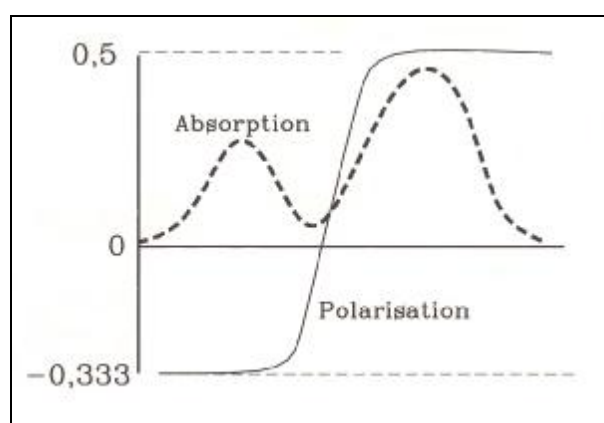


Abb. 19

Idealisiertes Polarisationspektrum $p_0(\lambda)$ eines hypothetischen Moleküls (SCHMIDT, 2000).

Daraus ergibt sich für die Polarisation folgende Definition:

Gl. 5:
$$p_0 = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + I_{vh}} \quad \text{mit} \quad -\frac{1}{3} \leq p_0 \leq +\frac{1}{2}$$

I = Intensität des Fluoreszenz-emissionslichtes

v = vertikale Ausrichtung der Schwingungsebene des E-Vektors

h = horizontale Ausrichtung der Schwingungsebene des E-Vektors

Für die Polarisation mit ihren Grenzwerten folgt, dass zu deren Bestimmung die Messung von jeweils zwei weiteren Fluoreszenzanregungsspektren gemäß untenstehender Definition notwendig wird. Zur Erzeugung von polarisiertem Fluoreszenzlicht dienen Polarisationsfilter (Schott, Mainz). Diese werden in die Strahlengänge des Anregungs- und des Emissionslichtes eingesetzt und erlauben damit die Transmission des E-Vektors nur in einer definierten Orientierung.

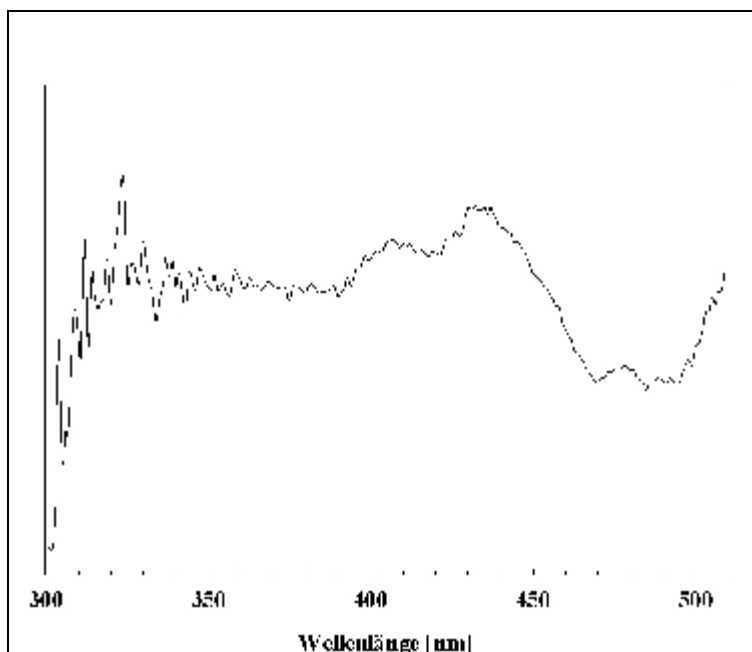
I_{vh} = Intensität des Emissionslichtes bei vertikaler Ausrichtung
des Polarisationsfilters im Anregungs- und horizontaler
Orientierung im Emissionsstrahlengang

I_{vv} = Intensität des Emissionslichtes bei vertikaler Ausrichtung
beider Polarisationsfilter

3.5.4 Korrektur von Fluoreszenzspektren

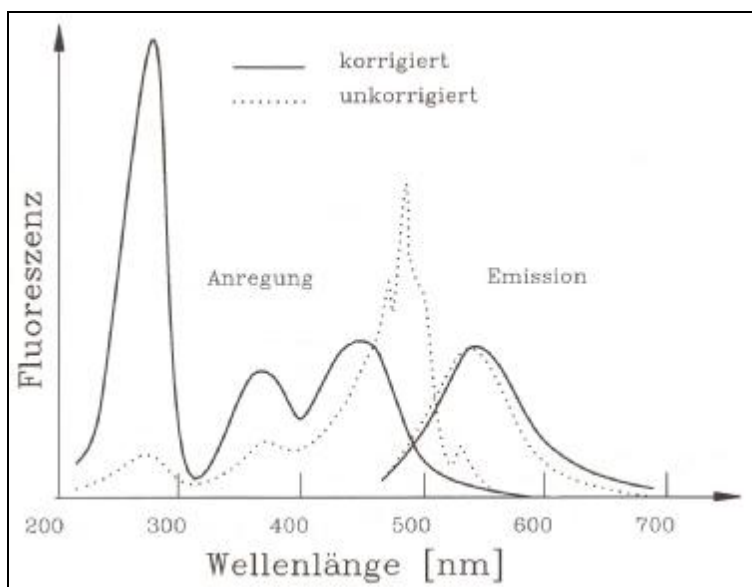
Da gerätespezifische Dispersion die Fluoreszenzspektren verzerrt, ist es notwendig, diese zu korrigieren. Wellenlängenabhängig werden Verzerrungen durch Lampe und Gittermonochromatoren verursacht. Wegen der Gleichheit von Absorptions- und Anregungsspektrum lässt sich daher ein Korrekturfaktor für die Anregungsspektren definieren (SCHMIDT, 2000):

Gl. 6:
$$\text{Korrekturfaktor } A(\lambda) = \frac{\text{Absorptionsspektrum}}{\text{Anregungsspektrum}}$$

**Abb. 20**

Darstellung des wellenlängenabhängigen Faktors zur Korrektur der Fluoreszenzanregungsspektren.

Durch Multiplikation der gemessenen Anregungsspektren mit diesem Korrektiv werden diese mit den Absorptionsspektren vergleichbar. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Notwendigkeit der Korrektur.

**Abb. 21**

Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren von Flavin in wässrigem Lösungsmittel, gemessen und korrigiert. Anregungsspektren werden durch das System stark verzerrt und bedürfen unbedingt einer Korrektur, während Emissionsspektren nur leicht modifiziert und verschoben werden (SCHMIDT, 2000).

3.6 Riboflavin-Bindungsexperimente

3.6.1 Riboflavin-Bindungsexperimente mit unbehandelten Kristallen

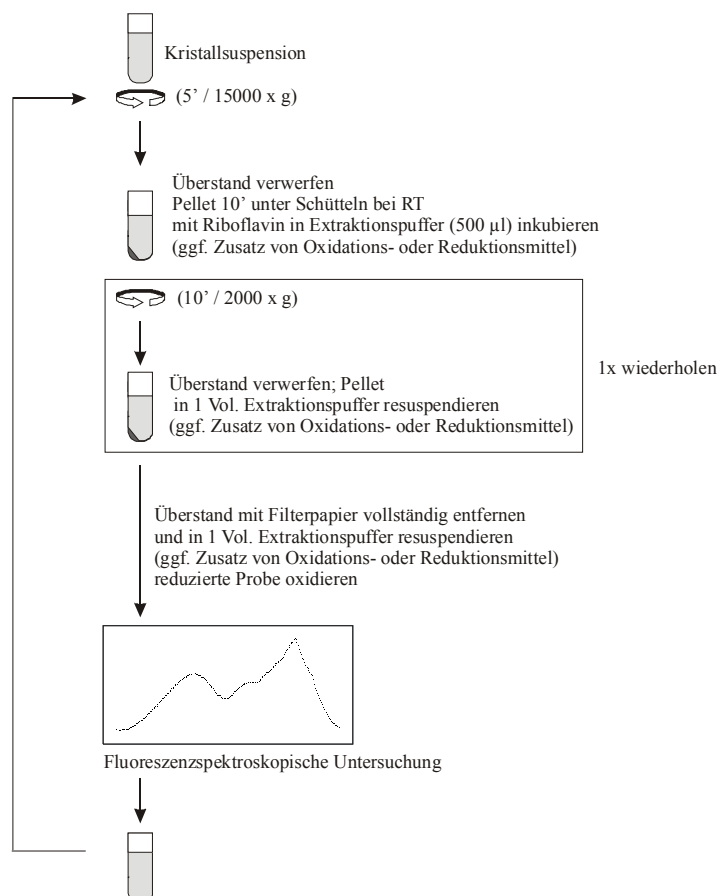


Abb. 22

Ablauf der Riboflavin-Bindungsexperimente mit oktaedrischen Kristalle aus *Phycomyces blakesleeana*.

Die oktaedrischen Kristalle wurden, wie in Abb. 22 dargestellt, für die Untersuchungen im Bindungsexperiment mit Riboflavin behandelt. Die isolierten und in 1200 µl Natriumphosphatpuffer resuspendierten Kristalle wurden in 170 µl-Aliquots für die Bindungsexperimente eingesetzt. Ein Aliquot fand für die Proteinbestimmung mit CBQCA Verwendung. In den Bindungsexperimenten wurden die Aliquots bis zu dreimal verwendet, jeweils mit steigender Konzentration exogenen Riboflavins, um die Fehler durch Kristallverluste während der Waschschrte so gering wie möglich zu halten. Die Kristallproben für die Bindungsexperimente unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen entstammten alle der gleichen Ausgangssuspension, um vergleichbare Kristallmengen zu gewährleisten. Nach Zentrifugation und vollständigem Entfernen des Pufferüberstandes mit Hilfe von Saugpapier erfolgte die zehnminütige Inkubation mit Riboflavin unter leichtem Schütteln bei RT. Gefolgt

von einer zehnminütigen Zentrifugation bei 2000 x g und RT wurde die Inkubationslösung rückstandslos entfernt und die Kristalle in Natriumphosphatpuffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgten sofort die Fluoreszenzmessungen.

3.6.2 Bindung unter oxidierenden Bedingungen

In den Untersuchungen zur Bindung von Riboflavin unter oxidierenden Bedingungen wurden die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen aliquotierten Kristallsuspensionen in Natriumphosphatpuffer, dem $K_3[Fe(CN)_6]$ bis zu einer Endkonzentration von 4mM zugesetzt war, inkubiert. Die weitere Behandlung entsprach der Beschreibung im vorhergehenden Abschnitt (Abb. 22). Eingesetzt wurden Riboflavinkonzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-4} M.

3.6.3 Bindung unter reduzierenden Bedingungen

Sollte die Bindung von Riboflavin unter reduzierenden Bedingungen stattfinden, wurde dem Natriumphosphatpuffer Natriumdithionit mit einer Endkonzentration von 8 mM frisch zugesetzt. Die Behandlung der Kristalle entsprach dem Ablauf in Abb. 22. Die Inkubation fand mit den gleichen Riboflavinkonzentrationen statt wie unter den oxidierenden Bedingungen.

3.6.4 Riboflavin-Bindungsnachweis mittels differentieller Zentrifugation

Um zu zeigen, dass die oktaedrischen Kristalle Riboflavin binden können und nur gebundenes Riboflavin nachgewiesen wird, diente eine differentielle Zentrifugation durch ein Kissen aus 50%(w/v) Saccharose. Wie zuvor beschrieben, wurden Kristalle der Mutante *C171* in 10^{-6} M Riboflavin inkubiert und der gesamte Ansatz in einem 2 ml-Reaktionsgefäß über ein gleiches Volumen Saccharose geschichtet. Nach 30 min Zentrifugation bei 2000 x g und 4°C traten die Kristalle durch die Saccharose, während das ungebundene Riboflavin aufgrund seiner geringeren Dichte im Überstand blieb. Das Pellet wurde in 1 Volumen Natriumphosphatpuffer resuspendiert und sofort fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen analog der Abb. 22 mit anschließender Fluoreszenzmessung.

3.6.5 Kalibriergerade mit definierten Riboflavinkonzentrationen

Für die quantitative Bestimmung der Riboflavinmengen im Rahmen der Bindungsexperimente wurde eine Kalibriergerade mittels definierter Riboflavinkonzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-4} M (in Natriumphosphatpuffer) angefertigt. Um bei der Fluoreszenzmessung Artefakte durch Kristalle zu kompensieren, erfolgte die Messung der Eichlösung auch in Anwesenheit von Kristallen. Isolierte Kristalle (gesammeltes Material von 9 Petrischalen der Mutante *C171*) wurden in 500 μ l Natriumphosphatpuffer resuspendiert. Von dieser unbehandelten Probe wurden einerseits Fluoreszenzanregungsspektren mit fixierter Emission bei 530 nm aufgenommen und die Fluoreszenzwerte bei 470 nm für die weitere Auswertung herangezogen. Diese Messungen ohne Zusatz von Riboflavin dienten als Nullproben. Anschließend wurden die Kristalle 5 min bei 15000 x g und RT pelletiert, der Überstand vollständig entfernt und durch 10^{-9} M Riboflavin ersetzt und anschließend wieder die Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Dieser Ablauf wurde für die übrigen Konzentrationen wiederholt. Die Fluoreszenzwerte bei 470 nm der Anregungsspektren mit Emission bei 530 nm wurden nach Abzug der entsprechenden Werte der Nullprobe gegen die Riboflavinkonzentration aufgetragen. Mittels der Ausgleichsgeraden konnte so später der Fluoreszenz bestimmte Riboflavinkonzentrationen zugeordnet werden.

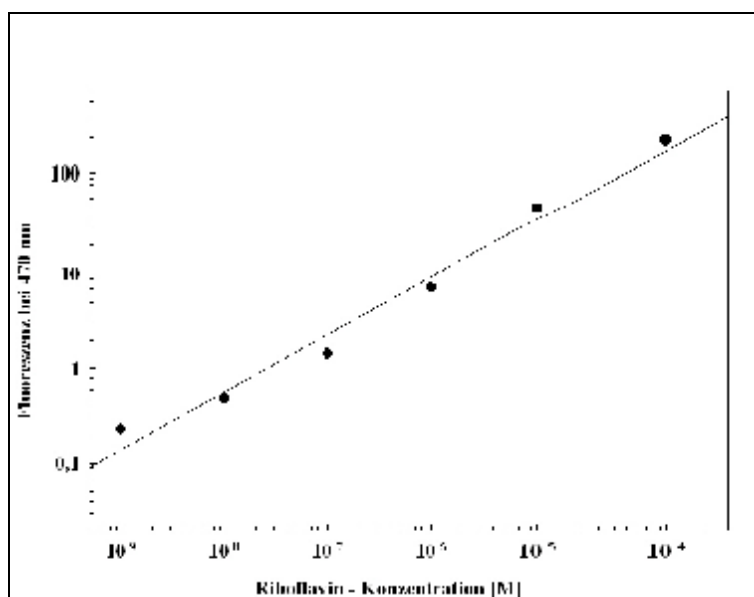


Abb. 23

Kalibriergerade für die Riboflavin-Bindungsexperimente.

3.6.6 Scatchard-Plot-Analyse der Bindungsexperimente

Mit Hilfe einer Auftragung der Ergebnisse der Bindungsexperimente in einem Scatchard-Plot (SEGEL, 1976) lassen sich die Dissoziationskonstanten K_D der Riboflavin-Kristall-Bindung in Abhängigkeit vom Redoxzustand der Kristalle bestimmen sowie Aussagen über die Zahl der Flavin-Bindungsstellen am Kristall treffen. Nach dem Massenwirkungsgesetz Gl. 7 lassen sich die Reaktionspartner folgendermassen definieren:



Dem Scatchard-Plot liegt folgende Gleichung zugrunde:

Gl. 8:
$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_D}(B) + \frac{B_{\max}}{K_D}$$

B: gebundene Ligandenkonzentration
F: freie Ligandenkonzentration
B_{max}: maximale Rezeptorbindungsstellen

Die Steigung der Geraden ist $-1/K_D$. Ihr Schnittpunkt mit der Abszisse stellt den Wert von B_{\max} dar und der Schnittpunkt mit der Ordinate ergibt den Wert B_{\max}/K_D .

3.7 Bakterienstämme, Vektor und Phagen

3.7.1 Bakterienstämme

Folgende Stämme des Bakteriums *Escherichia coli* fanden Verwendung:

XL1-Blue MRF' (Stratagene, Heidelberg):

Genotyp: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB\text{-}hsdSMR\text{-}mrr)173 \textit{endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$ [F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn5 (Kan^r)]

DH5 α (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe):

Genotyp: F⁻ Ø80 *lac* ZΔM15 (*lac* ZY A-*arg*F)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺)*phoA supE44 thi-1 gyrA96, relA1λ*]

LE 392 (Promega, Mannheim):

Genotyp: F⁻, *hsdR514* (r_k⁻, m_k⁻), *supE44*, *supF58*, *lacY1* or $\Delta(lacIZY)6$, *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*, λ -

3.7.2 Klonierungsvektor

Als Vektor für die Klonierungen diente der Phagemidvektor pBluescript II KS (+) (Stratagene, Heidelberg).

3.7.3 Phagen und genomische DNA-Bibliothek

Die genomische DNA-Bibliothek von *Phycomyces blakesleeanus* war in den Bakteriophagen LambdaGEM-11 (Promega, Mannheim) verpackt. Sie wurde freundlicherweise von der AG Prof. Dr. A. P. Eslava (Departamento de Microbiologia y Genetica / Universidad de Salamanca) zur Verfügung gestellt.

3.7.4 Anzucht und Lagerung

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit Bakterien wurden auf einer Sterilbank (Gelaire TC-A 48, Flow Laboratories, Meckenheim) durchgeführt. Zum Animpfen von Agarplatten wurden von -70°C-Dauerkulturen mit einer Impföse etwas Material entnommen (ohne die Dauerkultur aufzutauen), auf Selektionsmedium ausgestrichen und bei 37°C ü.N. inkubiert. Flüssigkulturen (3-5 ml Übernachtskulturen in LB-Medium) wurden durch Entnahme einer einzelnen Kolonie von der Agarplatte inokuliert und ü.N. bei 37°C inkubiert (Inkubationshaube Faust Unihood, UniEquip, Martinsried mit Rollordrum TC-7, New Brunswick Scientific, Edison, USA). Auf besondere Anzuchtmethoden wird in den einzelnen Abschnitten gesondert eingegangen. Die Lagerung von beimpften Agarplatten konnte mehrere Wochen im Kühlschrank erfolgen. Für die dauerhafte Lagerung von Bakterien wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl Glycerinlösung vermischt, in einem verschraubbaren 1,5 ml-Reaktionsgefäß in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Glycerinlösung

65	% (v/v)	Glycerol (100 %)
0,1	M	MgSO ₄
0,025	M	Tris-HCl (pH 8)

3.7.4.1 Herstellung der Bakterienmedien

Alle Medien (Rezepte im Anhang) wurden, soweit nicht anders angegeben, hitzesterilisiert. Die optionale Zugabe des sterilfiltrierten Antibiotikums Ampicillin zum LB-Medium (Endkonzentration 100 µg/ml) erfolgte erst nach Abkühlung auf 50-55°C.

3.8 Screening genomischer DNA-Bibliotheken in Phagen

3.8.1 Herstellung von Plating-cells

Mit 500 µl einer Übernachtskultur des Bakterienstammes *E.coli* LE 392 wurden 50 ml LB-Maltose inokuliert und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD₅₉₀ von 1 inkubiert. Die Kultur wurde 10 min mit 1000 x g bei 4°C pelletiert und anschließend in soviel kaltem 10 mM MgSO₄ resuspendiert, dass eine OD₅₉₀ von 1 resultierte. Die Plating-cells wurden frisch verwendet.

3.8.2 Phagentiterbestimmung

Um für das Screening der DNA-Bibliothek ausreichend Phagenplaques auf der Agarplatte zu erhalten, war es notwendig, zunächst den Titer des einzusetzenden Phagenstocks zu bestimmen. Dazu wurden Aliquots einer Verdünnungsreihe zur Infektion des Wirtsbakterienstammes verwendet. Aus den 1:100-Schritten der Verdünnungsreihe wurden jeweils 10 µl Phagensuspension mit je 200 µl Plating-cells in einem 500µl-Reaktionsgefäß vermischt und 20 min bei RT zur Adsorption der Phagen an die Wirtsbakterien inkubiert. Während weiterer 10 min Inkubation bei 37°C injizierten die Phagen ihre DNA in die Bakterien.

3.8.3 Ausplattieren der Bibliothek

Um ein vorzeitiges Erstarren der Topagarose zu verhindern, wurden die LB-Platten und alle für die weitere Herstellung der LB-Topagaroseplatten notwendigen Geräte im Wärmeschränk bei 37°C vorgewärmt. Die Topagarose wurde in einem Mikrowellengerät geschmolzen, 10 min bei RT abkühlen lassen und anschließend in einem Wasserbad auf einer Temperatur von etwa 45-

50°C gehalten. Nachdem das Phagen-Bakterien-Gemisch in einem Zentrifugenröhrchen mit 3-4 ml Topagarose versetzt worden war, wurde der gesamte Ansatz unter leichtem Schwenken gleichmäßig auf einer LB-Platte verteilt. Nach dem Erstarren der Topagarose schloss sich die Inkubation der Platten bei 37°C für etwa 18 Stunden an. Aus dem eingesetzten Volumen, der Verdünnung der Phagensuspension und der Zahl der Plaques auf der Platte konnte die Zahl der Plaque-forming-units pro Milliliter Phagenstock (pfu/ml) ermittelt werden.

3.8.4 Plaquelifts

Für das Screening von LB-Platten mit einem Durchmesser von 92 mm eignet sich eine Plaquedichte von $5-8 \times 10^3$ pro Platte mit einem Durchmesser der Plaques von 0,5-1 mm. Voraussetzung für das Screening einer DNA-Bibliothek war eine Abschätzung darüber, wie hoch die Zahl der pfu sein musste, damit das Genom mindestens einmal repräsentiert war. Im Falle von *Phycomyces blakesleeanus* mit einer Genomgröße von 40Mb und einer Durchschnittsgröße der Inserts in der genomischen Bank von 15-20 kb wäre das Genom theoretisch durch 2000 Klone vollständig repräsentiert worden. Für das Screening wurden 10 Platten mit jeweils ca. 6×10^3 pfu verwendet. Je 10 µl einer geeigneten Verdünnung der Phagensuspension wurden, wie in den Abschn. 3.8.2 u. 3.8.3 beschrieben, mit jeweils 200 µl Plating-cells inkubiert und ausplattiert. Die Inkubationsdauer betrug 4-4,5 Stunden.

3.8.5 Membrantransfer der DNA

Nach dem Ausplattieren mussten die Klone für die Hybridisierung auf Membranen transferiert werden, ein Vorgang, der als ‚Plaquelift‘, ‚Filterlift‘ oder ‚Filter ziehen‘ bezeichnet wird. Da die Plaques mit Phagenpartikeln angereichert waren, reichte es aus, eine passende Nitrocellulosemembran (Protran BA; Schleicher & Schuell, Dassel) für wenige Minuten auf die Agarplatte, die sogenannte Masterplatte, zu legen. Zur Kontrolle, ob nach Hybridisierung der ersten Filterlift-Runde die positiven Signale glaubhaft waren, wurden zweimal Membranabdrücke von derselben Agarplatte gemacht. Die entsprechend beschrifteten und markierten Membranen wurden mit einer Pinzette in einer ersten Serie jeweils eine Minute aufgelegt; die zweite Serie jedoch zwei Minuten, um noch genügend Phagenpartikel transferieren zu können und später ein gutes Hybridisierungssignal zu erhalten. Während der

Transferzeit wurde mit einer Injektionsnadel die Position der Membran anhand dreier asymmetrisch angeordneter randständiger Einstiche markiert, um dadurch später einem Hybridisierungssignal ein Plaque zuordnen zu können. Die Membranen wurden vorsichtig mit der Pinzette abgenommen und nacheinander denaturiert, neutralisiert und gewaschen.

3.8.6 Denaturieren

Zum Denaturieren der Phagenpartikel wurden die Membranen nun 2 min mit der DNA-Seite nach oben auf zweilagiges mit Denaturierungslösung getränktes Whatman-Papier gelegt, um sich vollzusaugen. Dabei war darauf zu achten, dass die Filter nicht in die Lösung eintauchten, um eine unnötige Diffusion der noch unfixierten DNA zu verhindern.

Denaturierungslösung

0,2 M NaOH

1,5 M NaCl

3.8.7 Neutralisieren

In gleicher Weise wie beim Denaturieren wurden die Filter anschließend neutralisiert.

Neutralisationslösung

2 x SSC

0,4 M Tris • HCl (pH 7,6)

3.8.8 Waschen

Im letzten Schritt wurden die Membranen 10 min durch leichtes Schütteln in 2 x SSC von anhaftenden Agaroseresten befreit und anschließend auf Whatman-Papier luftgetrocknet.

3.8.9 Immobilisieren der DNA auf der Membran

Die transferierten Nukleinsäuren konnten durch zweistündiges Backen bei 80°C auf der Nitrocellulosemembran immobilisiert werden.

3.8.10 Weitere Screeningrunden

Durch Hybridisierung mit einer Gensonde positiv identifizierte Phagenplaques ließen sich aufgrund der asymmetrischen Markierung der Membran eindeutig auf der Masterplatte lokalisieren. Die Plaques wurden mit der Rückseite einer Pasteurpipette ausgestochen und in je 1 ml SM-Puffer aufgenommen. Der Zusatz von 1-2 Tropfen Chloroform verhinderte Bakterienwachstum und führte zur Lyse noch nicht aufgelöster Bakterien. Nach kräftigem Schütteln konnte nun eine weitere Screeningrunde (Sekundärscreening) durchgeführt werden. Um die Klone weiter zu vereinzeln, wurde der Phagentiter auf etwa $1,5 \times 10^2$ pfu pro Petrischale reduziert. Eine dritte Screeningrunde mit einem Phagentiter von max. 50 pfu pro Petrischale stellte sicher, dass solitäre Plaques positiver Klone ausgestochen werden konnten. Die Lagerung erfolgte im SM / Chloroform-Puffer im Kühlschrank.

SM-Puffer

100 mM NaCl
8,5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

3.8.11 Herstellen von Phagenstocks

Für die weitere Isolierung der genomischen DNA war es notwendig, Arbeits-Stammlösungen der Klone mit ausreichend konzentriertem Phagentiter vorzuhalten. Dazu wurden, wie in 3.8.2 u. 3.8.3 beschrieben, mittels Verdünnungsreihe Phagen der isolierten Klone der dritten Screeningrunde in geeigneter Konzentration ausplattiert, damit daraus keine Einzelplaques, sondern eine vollständige Lysis des Bakterienrasens resultiert. Auf die durchlysierten Petrischalen wurden je 3 ml SM-Puffer gegeben und diese leicht geschwenkt. Zur Phagenelution über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, wurde das Eluat im Anschluss abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und die Platte nochmals mit 1 ml SM-Puffer nachgespült. Das Eluat wurde vereinigt und mit 100 µl Chloroform versetzt, um restliche Bakterien zu lysieren. Nach

kräftigem Schütteln und zehnminütiger Zentrifugation bei 4°C und 4000 x g konnte der Überstand abgenommen, mit wenigen Tropfen Chloroform versetzt und im Kühlschrank gelagert werden. Abschließend erfolgte noch eine Titerbestimmung der einzelnen Klone (siehe 3.8.2). Bei zu geringer Konzentration der Ausgangssuspension waren mehrere Amplifikationsrunden über Plattenlysate erforderlich.

3.9 Nukleinsäure-Präparation

3.9.1 Isolierung der DNA aus der genomischen Bibliothek

Die Isolierung von genomischer DNA aus zuvor ermittelten Klonen erforderte die Vermehrung von Phagen in größerem Maßstab als für die Plattenlysate notwendig. Diesem Zweck diente eine Schüttelkultur in Flüssigmedium.

3.9.1.1 Amplifikation der Klone mittels Flüssiglysate

In Anlehnung an das in Abschn. 3.8.2 beschriebene Verfahren wurden 100 µl Phagen mit je 100 µl einer Übernachtskultur des *E.coli*-Wirtsstammes LE-392 und einer Lösung aus 10mM MgCl₂ / 10mM CaCl₂ 15 min bei 37°C inkubiert und damit eine 50 ml-NZCYM-Schüttelkultur inokuliert. Die Inkubation der Flüssigkultur bei 37°C erfolgte bis zum vollständigen Auflösen der Bakterien, was sich in einem plötzlichen Aufklaren der zuvor trüben Kultur und der Sedimentation des Bakteriendebris als weißlicher Faden äußerte. Durch Wahl der geeigneten Phagenkonzentration trat die Lysis der Kultur nach 6-8 Stunden ein. Um restliche Bakterien aufzulösen und die Phagen freizusetzen, wurden der Kultur 150 µl Chloroform zugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Zur Abscheidung des Bakteriendebris wurde das Lysat 15 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand konnte nach Zusatz von 150 µl Chloroform zum Schutz vor Bakterienwachstum in 50 ml-Schraubgefäßen (Greiner; Frickenhausen) im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden.

3.9.1.2 Präparation von DNA aus λ -Phagen

20 ml der Phagensuspension wurden in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und nach Zugabe von 20 μ l DNase I (5mg/ml) und 25 μ l RNase A (10mg/ml) eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation (1¼ h, 4°C, 130000 x g) konnte der Überstand verworfen und restliche Flüssigkeit vorsichtig mit Saugpapier von der Wand des Zentrifugenbechers entfernt werden. Zur Resuspension wurde das bernsteinfarbene Phagenpellet mit 500 μ l 50mM Tris/HCl (pH 8,0) überschichtet und 20-30 min bei RT inkubiert. Nach Transfer in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß erfolgte zum Destabilisieren der Phagenköpfe der Zusatz von 25 μ l 50 mM EDTA. Jeweils nach sorgfältigem Mischen wurden nacheinander 1,5 μ l Proteinase K (40 μ g/ml) und 10%ige SDS-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,5% zugegeben und zum Abbau der Proteinhülle 30 min bei 37°C inkubiert. Die Präparation wurde mit der in Abschn. 3.8.6 beschriebenen phenolischen DNA-Extraktion fortgesetzt.

3.9.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Phycomyces blakesleeianus*

Die Isolierung von genomischer DNA konnte durch die in Abschn. 3.3.2.5 erläuterte Anzucht von Myzel in Flüssig- / Schüttelkultur erheblich vereinfacht werden. Sobald das tiefgefrorene Myzel auf Eis aufgetaut war, konnte das Pulver mit 0,5-1ml Lysispuffer (ITURRIAGA et al., 1992) versetzt werden. Die nachfolgende 15-minütige Inkubation bei 65°C unter gelegentlichem Schütteln erleichterte das Resuspendieren und die Lyse der Hyphenwände. Nach dem Abkühlen auf RT wurden noch verbliebene Myzelreste für die Dauer von 15 min bei 4°C und 4000 x g pelletiert. Der Überstand konnte nun in ein neues 2ml-Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen ROTIPHENOL versetzt werden. Nach mäßigem Schütteln (zu starkes Schütteln, z.B auf einem Vortex, barg in diesem Falle die Gefahr, dass Scherkräfte die DNA zerstören) wurde zur Phasentrennung 15 min bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase konnte in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Zur Entfernung von RNA erfolgte eine einstündige Inkubation mit RNase A (Endkonzentration: 0,5 mg/ml) bei 37°C. Ein weiterer Verdau bei 37°C mit Proteinase K (0,5 mg/ml) und 0,5 % SDS (jeweils Endkonzentration) zur Inaktivierung der RNase und anderer Proteine schloss sich für eine Stunde an. Die DNA konnte nun phenolisch extrahiert werden.

Lysispuffer:	1 %	N-Lauroylsarcosin
	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	20 mM	Na ₂ EDTA

3.9.3 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Alkalischer Lyse

Die alkalische Lyse nach BIRNBOIM & DOLY (1979) führt dazu, dass nach dem Denaturieren durch SDS und NaOH lediglich die Plasmid-DNA durch Neutralisierung des Milieus in Lösung bleibt, Proteine und chromosomale Bakterien-DNA jedoch ausgefällt werden und sich pelletieren lassen.

3.9.3.1 Isolierung im kleinen Maßstab aus Übernachtskultur (Minipräparation)

1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden ca. 30 sek. bei 13000 x g und RT pelletiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Pellets in 100µl Lösung A und 1,5 µl einer RNase-Lösung (10 mg/ml) erfolgte eine 5minütige Inkubation bei RT. Dieser Schritt und das nachfolgende Mischen mit 200 µl Lösung B mit anschließender Inkubation auf Eis für 5 min. führte zur Lysis der Bakterien. Durch den Zusatz von 150 µl Lösung C konnten das mit Lösung B zugesetzte SDS und damit die Proteine quantitativ entfernt werden. Die nach kräftigem Schütteln entstandenen weißen Flocken wurden durch eine 3minütige Zentrifugation bei RT und 15000 x g pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und zur vollständigen Entfernung der Protein-SDS-Komplexe erneut wie zuvor zentrifugiert. Die im Überstand gelöste Plasmid-DNA konnte nach Zugabe von 800 µl 96%igem Ethanol in einem neuen 1,5ml-Reaktionsgefäß während einer 5minütigen Inkubation bei RT gefällt werden. Nach 30 min Zentrifugation bei 15000 x g wurde der Überstand quantitativ entfernt und das Pellet durch Mischen mit 1ml 70%igem Ethanol und kurzer Zentrifugation (1min., 15000 x g, RT) von noch verbliebenen Salzen befreit. Nach anschließendem Lufttrocknen wurde das Pellet in 25-30 µl TE oder EB resuspendiert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank oder dauerhaft bei -20°C.

Lösung A: 50 mM Glucose
 25 mM Tris-Cl pH 8
 10 mM EDTA
 Lagerung im Kühlschrank

Lösung B: 0,2 g NaOH
 2,5 ml 10% SDS
 22,5 ml ddH₂O
 frisch ansetzen, Lagerung bei RT

Lösung C: 3 M Kaliumacetat
 2 M Essigsäure
 Lagerung bei RT

3.9.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Für die Präparation von Klonierungsvektoren, DNA-Sonden und DNA-Fragmenten für Ligationen war es notwendig, die Fragmente nach Restriktion und Elektrophorese aus dem Agarosegel wieder zu eluieren. Die Rückgewinnung erfolgte durch Bindung an eine Silicamatrix in Gegenwart chaotroper Salze. Nach dem Ausschneiden der Banden aus dem Gel mit einem Skalpell wurde die DNA gemäß des Protokolls des JetSorb-Elutions-Kits von Genomed (Bad Oeynhausen) isoliert.

3.9.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Phycomyces blakesleanus*

Zur Präparation der Gesamt-RNA aus Sporangiphoren bzw. Myzel von *Phycomyces blakesleanus* wurde das TRIzol-Reagens (Life Technologies, Gaithersburg, USA) verwendet, ein Gemisch aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, das eine Weiterentwicklung der von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987) beschriebenen Ein-Schritt-RNA-Isolierungsmethode darstellt. Sie beruht auf der Eigenschaft von RNA, in einer sauren (pH 4) 4 M Guanidiniumisothiocyanatlösung in Anwesenheit einer organischen Phenol/Chloroform-Phase wasserlöslich zu bleiben, während sich Proteine, DNA und Fette in der organischen Phase und der Interphase befinden. Guanidiniumisothiocyanat ist eine der stärksten proteindenaturierenden Agenzien. Seine Anwendung wurde ursprünglich entwickelt, um RNA aus Zellen mit hohem RNase-Gehalt zu isolieren (CHIRGWIN *et al.*, 1979). Das in flüssigem Stickstoff zermörserte Pilzmaterial wurde gemäß dem den Produktinformationen beigefügten RNA-Isolierungsprotokoll behandelt.

3.9.6 Phenolische DNA-Extraktion

Für die phenolische Extraktion von DNA fand ROTIPHENOL (ROTH, Karlsruhe) Verwendung, eine gebrauchsfertige Lösung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, welches mit TE gesättigt und auf einen pH-Wert von 7,5-8,0 äquilibriert ist. Phenol und Chloroform führen bei diesem pH-Wert zu einer Denaturierung von Verunreinigungen, wie z.B. Proteinen, die sich in der Interphase zwischen Chloroform und Phenol ansammeln. Isoamylalkohol verhindert das Schäumen und die Entstehung einer intensiven Interphase. Bei

einem pH über 7,0 finden sich alle Nukleinsäuren in der wässrigen Oberphase. Unter pH 7,0 findet jedoch auch eine Denaturierung der DNA und deren Akkumulation in der Interphase statt. Bei einem pH-Wert um 4,5 ist dieser Effekt maximal, was man sich bei der RNA-Isolierung zu Nutze macht (siehe Abschn. 3.9.5). Zur Extraktion der DNA wurde zur Probe ein gleiches Volumen ROTIPHENOL zugesetzt, 5 min gut gemischt und anschließend 15 min bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die phenolische Extraktion so oft wiederholt, bis keine weiße Interphase mehr zu sehen war und eine klare wässrige Oberphase abgenommen werden konnte. Um restliches Phenol zu entfernen, erfolgte die Zugabe von einem Volumen Chlorform / Isoamylalkohol (24:1). Nach nochmaligem Schütteln und Zentrifugation in der oben beschriebenen Weise konnte die wässrige Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA ethanolisch gefällt werden.

3.9.7 Präzipitation von Nukleinsäuren

Durch Zugabe von monovalenten Kationen und Alkohol lassen sich Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen ausfällen. Dies kann durch Zugabe einerseits von 0,7 Vol. Isopropanol oder andererseits von 2,5 Vol. Ethanol geschehen. Sofern es das Volumen des Reaktionsgefäßes erlaubt, wurde ethanolisch gefällt. Die Fällung mit Ethanol verminderte die Kopräzipitation von Salzen und Zuckern (SAMBROOK et al., 1989) und verkürzte die Trocknungsdauer der Nukleinsäurepellets. Der Zusatz von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat erfolgte nur dann, falls die Lösung nicht schon vorher eine Salzkonzentration von mindestens 300 mM aufwies. Sofern nicht anders beschrieben, erfolgte die Fällung der Nukleinsäuren in der Regel über Nacht bei -20°C. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 15000 x g für 10-15 min. Zum Pelletieren der Nukleinsäuren konnte der Überstand verworfen und der Niederschlag zweimal mit 70%igem Ethanol versetzt, gut gemischt und 1 min. mit 15000 x g bei RT zentrifugiert werden. Dieses „Waschen“ diente dem Entfernen der Fällungssalze. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet luftgetrocknet und nachfolgend in TE-, EB-Puffer oder sddH₂O aufgenommen.

3.9.8 Lagerung von Nukleinsäuren

Die Lagerung von extrahierten Nukleinsäuren erfolgte einerseits in TE- oder EB-Puffer bei 4°C oder -20°C oder in sddH₂O bei -20°C. Um evtl. Einflüsse von EDTA auf nachfolgende

Behandlungen, wie z.B. Sequenzierung der Nukleinsäuren zu unterbinden, wurde für die Resuspension vorzugsweise EDTA-freier EB-Puffer verwendet.

3.10 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung, Isolierung und Identifizierung von Nukleinsäurefragmenten. In einer Gelmatrix werden die Banden anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Größeren Molekülen bietet das Agarosegel einen höheren Widerstand als kleinen Fragmenten, wodurch die Nukleinsäurefragmente, aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld zur Anode wandernd, der Größe nach aufgetrennt werden. Der Vergleich mit Nukleinsäurefragmenten definierter Länge, sog. Markern, erlaubt die Größenbestimmung der zu untersuchenden Nukleinsäuren.

3.10.1 Nicht denaturierende Gelelektrophorese von DNA

3.10.1.1 Vorbereiten der DNA-Agarosegele

Zur Auftrennung restringierter DNA-Fragmente wurden in der Regel Gele mit 0,7-0,8 % Agarose verwendet. Je nach Gelgröße und Probenvolumen wurde auch das Gelvolumen variiert. In 1 x TAE-Puffer suspendierte Agarose wurde in einem Mikrowellenofen bis zum völligen Auflösen aufgeköcht. Verdunstungsverluste des Puffers waren gegebenenfalls durch ddH_2O zu ersetzen. Nach Abkühlung auf etwa 50-55°C konnte Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) zugesetzt und die Agaroselösung in den Gelträger gegossen werden. Nach Polymerisation der Gele konnten sie je nach Bedarf, in Frischhaltefolie eingeschlagen, im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x TAE-Puffer gefüllt und das Gel im Gelträger eingesetzt. Mit Probenpuffer versetzte Proben wurden anschließend in die Geltaschen pipettiert und mit Spannungen von 4-7 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Nachdem die Bromphenolblaufront etwa $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ der Laufstrecke zurückgelegt hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

TAE-Puffer (50faches Konzentrat):	40	mM	Tris
	1	mM	Na ₂ -EDTA
	5,71	%	Eisessig
			→ pH 8

3.10.1.2 Vorbereiten der Proben

Für ein leichteres Einsinken in die Geltaschen wurden die DNA-Proben zuvor mit 1/6 Volumen 6x Probenpuffer gut vermischt. Um den Gellauf verfolgen zu können, war der Probenpuffer mit Bromphenolblau angereichert. Bei den hier verwendeten Agarosekonzentrationen entsprach das Wanderungsverhalten des Farbstoffes Bromphenolblau Fragmentlängen von etwa 600-700 bp.

6 x DNA-Probenpuffer:

0,6	%	SDS
0,25	%	Bromphenolblau
50	%	Saccharose
60	mM	Na ₂ -EDTA
		sddH ₂ O

3.10.1.3 DNA-Größenmarker

Um die Fragmentgröße restringierter DNA ermitteln zu können, wurde parallel zu den Proben ein sogenannter DNA-Größenmarker im Gel aufgetrennt. Folgende von MBI Fermentas, St. Leon-Rot bezogene Marker fanden Verwendung:

- λ-DNA restringiert mit *EcoRI/HindIII* (13 Banden von 564-21226 bp)
- λ-DNA restringiert mit *Eco47I* (36 Banden von 23-8126 bp)
- GeneRuler DNA-Ladder Mix (21 Banden von 100-10000 bp)

3.10.2 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Bei RNA kommt es häufig zur Ausbildung von Sekundärstrukturen. Um diese dauerhaft auch während der Elektrophorese zu entspannen, erfolgte die Auftrennung in Gegenwart von Formaldehyd (LEHRACH et al., 1977).

3.10.2.1 Schutzmaßnahmen gegen RNasen

Da RNasen im Gegensatz zu DNasen weitaus stabiler sind und durch herkömmliche Autoklaviermaßnahmen nicht inaktiviert werden können, mussten besondere Vorkehrungen

getroffen werden. Die verbreitetste Methode ist die Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC). Da aber diese Substanz aufgrund ihrer Karzinogenität nicht unproblematisch ist, wurden alternativ alle Lösungen und Utensilien mit mehrfach lange autoklaviertem ddH₂O angesetzt oder behandelt. Glasgeräte wurden 4h bei 200-220°C trockensterilisiert. Wasser und alle autoklavierbaren Utensilien wurden zweimal mindestens 1h autoklaviert. Geräte für die Elektrophorese und den Northerntransfer wurden gründlich mit 0,5 % SDS abgewischt und mit ddH₂O gespült. Nach Reinigen mit 96% Ethanol und Trocknen erfolgte eine 10-minütige Inkubation in 0,1 M NaOH bei RT. Erneut mussten die Geräte mit ddH₂O gründlich gespült und anschließend mit 3 % H₂O₂ abgewischt werden. Es schloss sich wieder eine gründliche ddH₂O-Spülung an, und nach dem Trocknen konnten die Utensilien verwendet werden.

3.10.2.2 Vorbereiten der RNA-Agarosegele

Zur Auftrennung der RNA wurden 1,2 %ige Agarosegele vorbereitet. Für ein Gel der Größe 10 x 15cm (100 ml) wurden 1,2 g Agarose in 77,1 ml ddH₂O im Mikrowellenofen bis zum vollständigen Lösen erhitzt und anschließend im Wasserbad auf 60°C gehalten. Verdunstungsverluste wurden durch ddH₂O ersetzt. Dann erfolgte unter dem Abzug der Zusatz von 5 ml 20 x MOPS-Puffer und 17,9 ml 37 % Formaldehyd. Das Gemisch konnte nun in den vorbereiteten Gelträger gegossen werden.

3.10.2.3 Probenvorbereitung

Die Proben wurden mit 5 x Denaturierungspuffer versetzt, mit ddH₂O auf das gleiche Volumen gebracht, zur Beseitigung von Sekundärstrukturen 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/µl) und kurzem Anzentrifugieren konnten die Proben aufgetragen werden.

20 x MOPS-Puffer:

0,4 M MOPS
0,1 M Natriumacetat-Dihydrat
20 mM EDTA
→ pH 7,0
sterilfiltrieren

5 x Denaturierungspuffer:

200 µl	20 x MOPS
200 µl	Glyzerin
308 µl	Formamid
72 µl	37 % Formaldehyd
5 µl	gesättigtes Bromphenolblau

3.10.2.4 RNA-Größenmarker

Zur Ermittlung der Fragmentgröße in RNA-Gelen oder zur Zuordnung von Hybridisierungssignalen wurde analog den DNA-Gelen ein speziell zusammengesetzter RNA-Größenmarker eingesetzt (RNA-Ladder High Range, MBI Fermentas, St. Leon-Rot), der mit 8 Banden einen Bereich von 200-6000 bp abdeckt.

3.10.2.5 Durchführung der Elektrophorese

Das erstarrte Gel wurde zunächst 15-20 min im Elektrophoresepuffer bei 1-1,5 V/cm äquilibriert, bevor die Proben aufgetragen werden konnten. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 5 V/cm solange, bis die Bromphenolblaufront etwa $\frac{2}{3}$ der Laufstrecke zurückgelegt hatte.

Elektrophoresepuffer:

50 ml	20 x MOPS
20 ml	37 % Formaldehyd
930 ml	sddH ₂ O

3.10.3 Fotografische Dokumentation der Gelelektrophorese

Die Dokumentation der Elektrophoreseergebnisse erfolgte durch Fotografie der Gele auf einem UV-Schirm. Alternativ wurde auch eine an die Fotoanlage angeschlossene computergestützte Bildverarbeitung verwendet.

3.11 Nukleinsäure-Nachweismethoden

3.11.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA erfolgte mit Hilfe eines Zweistrahlphotometers. Grundlage für die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren war die Bestimmung der optischen Dichte (OD) an ihrem Absorptionsmaximum bei 260 nm (OD_{260}) und die Verwendung von Quarzküvetten, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Bei Verwendung von Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm ergaben sich folgende molare Extinktionskoeffizienten (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998):

Einer OD_{260} von 1 entsprechen:

50 µg/ml	doppelsträngige DNA
40 µg/ml	einzelsträngige DNA
33 µg/ml	einzelsträngige RNA

Neben der Bestimmung des Nukleinsäure-Absorptionsmaximums war auch die Bestimmung des Absorptionsmaximums für Proteine bei 280 nm wichtig, um aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäure-Probe ziehen zu können. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen Wert von 1,8, wogegen RNA bei einem Wert von 2,0 liegt. Verunreinigungen durch Proteine oder noch vorhandenes Phenol verringern die Werte drastisch. Für die Messung wurden die Proben jeweils 1:100 verdünnt, gegen das Lösungsmittel gemessen und die Konzentration nach Gleichung 9 bestimmt.

Gl. 9: Nukleinsäure-Konzentration [µg/µl] = (OD_{260} x molarer Extinktionskoeffizient x Verdünnung x 10^{-3})

3.11.2 Ethidiumbromidfärbung von Nukleinsäuren

Ethidiumbromid besitzt die Eigenschaft, mit Nukleinsäuren zu interkalieren. Wird es mit UV-Licht (312 nm) angeregt, so lassen sich durch die Emission von Licht der Wellenlänge von 590 nm Nukleinsäuren visualisieren. Da die Interkalation äquimolar stattfindet, erlaubt dies neben der eigentlichen Sichtbarmachung auch eine Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren.

3.11.2.1 DNA-Mengenstandard

Zur Konzentrationsabschätzung kleiner Nukleinsäuremengen im Nanogramm-Bereich diene der Intensitätsvergleich der Ethidiumbromidfluoreszenz definierter Mengen von DNA des Bakteriophagen λ mit der unbekannten Probe, die gemeinsam 15-20 min in einem Agarosegel laufen.

3.12 Blotting von Nukleinsäuren

Um mittels Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden Zielsequenzen nachweisen zu können, war es erforderlich, diese zuvor auf geeignete Membranen zu transferieren.

3.12.1 Southernblot

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter DNA auf Membranen für die nachfolgende Hybridisierung mit Gensonden wurde unter alkalischen Bedingungen mittels Kapillarblot durchgeführt. Abb. 24 verdeutlicht den Aufbau eines solchen Transfers.

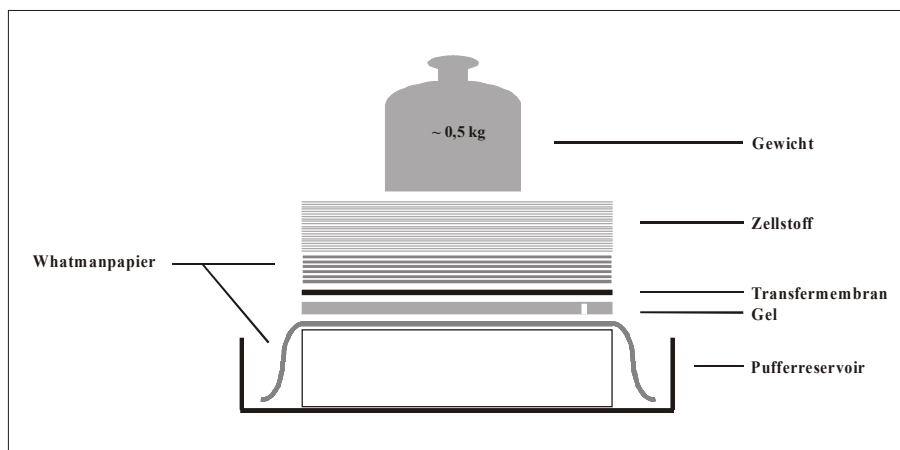


Abb. 24

Prinzipieller Aufbau eines Kapillarblots für den Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen.

Das Agarosegel wurde nach der Dokumentation zunächst in ddH₂O gründlich gespült und anschließend ca. 30 min. in 0,25 N HCl bis zum Farbumschlag des Bromphenolblau nach Gelb depurinieren. Dies diente der Fragmentierung hochmolekularer DNA und damit einem

effizienteren Transfer. Wie der Depurinierungsschritt erfolgten alle weiteren Inkubationen unter leichtem Schütteln bei RT. Nach Verwerfen der HCl-Lösung und gründlichem Waschen mit ddH₂O wurde das Gel in 1,5M NaCl/0,5M NaOH für 2 x 20 min. denaturiert, um die DNA einzelsträngig zu machen, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in Neutralisationslösung (1,5M NaCl/0,5M Tris-HCl (pH 7,0)). In der Zwischenzeit konnte nach dem Bestimmen der Gelabmessungen eine Nylonmembran Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg) mit etwa 3 mm kleinerer Kantenlänge zugeschnitten, 5 min. in ddH₂O gewässert und dann 20 min. in Transferlösung (0,25M NaOH/1,5M NaCl) äquilibriert werden. Währenddessen erfolgte der Zuschnitt der Whatman-Filter (Schleicher & Schuell, Dassel) und des Zellstoffs für den anschließenden Aufbau des Blots gemäß der Darstellung in Abb. 24. Das als Docht dienende, in das Pufferreservoir hineinragende, Whatman-Papier wurde gründlich in der Transferlösung gewässert und über die Unterlage gelegt. Darauf wurde das Gel mit nach unten orientierten Taschenöffnungen positioniert, darüber die Nylonmembran und auf diese wiederum ein in Transferpuffer getränktes Stück Whatman-Papier. Nach und nach folgten ein etwa 1,5 cm hoher Whatman-Papier-Stapel und eine etwa 2-3 cm dicke Zellstoffschicht. Ein Gewicht von ca. 0,5 kg diente zum Beschweren und Fixieren des Aufbaues. Um eine Unterbrechung des Transfers zu verhindern, mussten mittels einer Glaspipette sorgfältig Luftblasen zwischen dem Gel und den einzelnen Membranen ausgerollt werden. Darüber hinaus verhinderte die kleinere Kantenlänge von Nylonmembran und darübergeschichtetem Whatman-Papier einen Bypass der Transferlösung und damit ebenfalls einen ineffizienten Transfer der Nukleinsäuren. Eine Abdeckung der offenen Flächen des Pufferreservoirs mit Frischhaltefolie schützte vor Verdunstungsverlust des Transfermediums während des über Nacht dauernden 14stündigen Kapillarblots. Während des Abbaus des Blots erfolgte mit einem Kugelschreiber die Markierung von Position und Orientierung des Geles auf der Nylonmembran, bevor diese zur Entfernung von Gel- und Transferlösungsresten etwa 5-10 min. in 2 x SSC gewaschen wurde. Nach dem Lufttrocknen der Nylonmembran konnte darauf die transferierte DNA immobilisiert werden. Die Lagerung der Nylonmembran erfolgte zwischen Whatman-Papier in Folie eingeschweißt bei RT.

3.12.2 Northernblot

Der Transfer von RNA entsprach im Aufbau dem im vorhergehenden Abschnitt dargestellten Southernblotverfahren. Um eine RNase-Verunreinigung der Gegenstände, die während des Transfers mit der RNA in Kontakt kamen, zu verhindern, wurden diese den in Abschn. 3.10.2.1

beschriebenen Reinigungsschritten unterzogen. Das Gel wurde nach der fotografischen Dokumentation 30 min in 0,05M NaOH/1,5M NaCl inkubiert, anschließend 20 min in 0,5M Tris-HCl (pH 7,4) / 1,5M NaCl neutralisiert und dann für weitere 45 min in Transferlösung (10x SSC) äquilibriert. Die passend zugeschnittene Nylonmembran Hybond-N wurde ebenfalls in der Transferlösung für 10 min inkubiert. Der Transfer erfolgte über Nacht für etwa 20-24h. Die Membran wurde anschließend 5-10 min in 2x SSC gewaschen und luftgetrocknet. Nach Immobilisierung der transferierten RNA erfolgte die Lagerung wie im Falle des Southernblots.

3.13 Radioaktive Markierung von Gensonden

Der Nachweis von Zielsequenzen durch Hybridisierung von Northernblots, Southernblots oder Filterlifts erforderte die radioaktive Markierung zuvor hergestellter Nukleotidsequenzen. Je nach Einsatzzweck, Art und Länge der Sonde kamen hierfür zwei Markierungsmethoden in Frage.

3.13.1 Markierung durch „endlabeling“

Bei dieser Methode katalysiert die T4 Polynukleotidkinase den Transfer des terminalen γ -Phosphates des ATP an die OH-Gruppe des 5'-Endes von Oligonukleotiden. Werden Oligonukleotide für die Hybridisierung verwendet, so eignet sich die Methode der Endmarkierung am besten. Im Vergleich zum „random prime labeling“ ist allerdings aufgrund des lediglich endständigen Einbaus von radioaktivem Phosphat die Signalstärke geringer (MÜLHARDT, 2002). Für die Kinasierungsreaktion wurde die T4 Polynukleotidkinase von MBI-Fermentas (St.Leon-Rot) eingesetzt.

Markierungsansatz:

	10	μ l	synthetisiertes Oligo (2 pmol/ μ l)
	1,5	μ l	BSA (1 mg/ml)
	3	μ l	Kinase-Reaktionspuffer
Im Isotopenlabor:	8	μ l	$[\gamma^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (3000 Ci/mM)
	1,5	μ l	T4 Polynukleotidkinase (15 U)
	6	μ l	sddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 2 μ l 0,5M EDTA die Reaktion beendet.

3.13.2 Markierung durch „random prime labeling“

Bei der Verwendung von aufgereinigter doppelsträngiger DNA als Sonde erfolgte die Markierung in Anlehnung an die von FEINBERG & VOGELSTEIN (1984) entwickelte Methode des „random prime labeling“. Hierzu dient die aufgereinigte DNA als Matrize zur Synthese ca. 200bp langer DNA-Fragmente. Eine Mischung synthetisch hergestellter Hexamere mit zufälliger Basenanordnung dient als Primer für das Klenow-Fragment der Polymerase I aus *E. coli*. Dessen Verwendung verhindert den Abbau des Syntheseproduktes (KLENOW & HENNINGSEN, 1970). Durch den wiederholten Einbau von [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP in neu synthetisierte DNA-Fragmente resultiert eine hohe spezifische Aktivität.

Verwendung fand das „HexaLabel DNA Labeling“-Kit von MBI-Fermentas (St.Leon-Rot).

100 ng Matrizen-DNA und 10 μl Hexanukleotidmix im Reaktionspuffer wurden auf 40 μl mit sddH_2O ergänzt, 10 min auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis gelagert.

Markierungsansatz:

	Mix A:	1 μl	dCTP (0,33 mM)
		1 μl	dGTP (0,33 mM)
		1 μl	dTTP (0,33 mM)
Im Isotopenlabor:		6 μl	[$\alpha^{32}\text{P}$]dATP (3000 Ci / mM)
		1 μl	Klenow-Fragment (5U)

Der Ansatz wurde zunächst 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 4 μl dNTP-Mix ergänzt. Nach weiteren 10-15 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA gestoppt.

3.13.3 Entfernung nicht eingebauter Nukleotide

Um ein Hintergrundsignal durch nicht eingebaute, freie Nukleotide zu verhindern, sollten die markierten Proben aufgereinigt werden. Dazu wurde das QIAquick Nukleotide Removal Kit von QIAGEN (Hilden) verwendet. Die Reinigung basiert auf dem Prinzip der DNA-Bindung an einer Silica-Matrix in Abhängigkeit von Salzkonzentration und pH-Wert. In Gegenwart chaotroper Salze wird die DNA gebunden, während Kontaminationen, wie freie Nukleotide, in mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten entfernt werden. Die Zusammensetzung der Puffer ist, abgesehen von Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8), nicht bekannt. Der Reaktionsansatz wurde mit 10 Volumen (bzw. 5 Volumen bei zu reinigenden Fragmenten ≥ 100 bp) PN-Puffer versetzt, auf die in einem 2 ml-Reaktionsgefäß stehende Säule gegeben und 1 min mit 6000 x g bei RT zum Binden der DNA zentrifugiert. Der Durchfluss samt Reaktionsgefäß wurde verworfen und die Säule zweimal mit 500 μl PE-Puffer durch erneute Zentrifugation mit 6000 x

g gewaschen. Nach Austausch des Reaktionsgefäßes wurde restlicher Puffer durch eine dreiminütige Zentrifugation mit 13000 x g entfernt. Durch Zugabe von 100-200 µl EB-Puffer und Inkubation bei RT (1 min) konnte nun die gereinigte Sonde durch einminütige Zentrifugation bei RT und mit 13000 x g in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert und in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

3.14 Flüssigszintillationszählung

Die Flüssigszintillationszählung basiert auf der Umwandlung von radioaktiver Strahlung in Lichtemission. Da der quantitative Nachweis schwach radioaktiver Strahlung aufgrund der Absorption des umgebenden Mediums oft nicht möglich ist, werden bei der Flüssigszintillationszählung die an eine Matrix gebundenen Proben in einen Cocktail aus speziellen organischen Verbindungen (Quicksafe A; Zinsser Analytic, Frankfurt a. M.) gegeben. Diese emittieren nach Anregung durch radioaktive Strahlung Lichtenergie, die in einem Detektor mit Hilfe eines Photomultipliers verstärkt und quantitativ ausgewertet werden kann.

Die beiden DE-81-Filter mit dem gereinigten und dem ungereinigten Aliquot des Markierungsansatzes wurden in sogenannte „scintillation vials“ gegeben, mit Szintillationsflüssigkeit überschichtet und die Anzahl der Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt.

3.14.1 Bestimmung der Inkorporationsrate

Eine Abschätzung, wie hoch der relative Anteil der eingebauten Aktivität gemessen an der Gesamtaktivität war, ließ sich einfach mit einem Filteressay, in Anlehnung an das „HexaLabel DNA Labeling“-Kit-Protokoll, überprüfen.

1 µl des ungereinigten Markierungsansatzes wurde 1:100 mit TE-Puffer verdünnt. Jeweils 2 µl davon wurden auf je einen Whatman-DE 81-Filter (1,5 x 1,5 cm) aufgegeben. Ein Filter wurde bei RT getrocknet, während von dem zweiten Filter durch mehrere Waschschriffe die nicht eingebaute Aktivität entfernt wurde:

Waschschritte:

3 x	5 min	2 x SSC
1 x	1 min	sddH ₂ O
1 x	1 min	96% Ethanol

Die Lösungen wurden jeweils abgegossen, der Filter zum Schluss vorsichtig aus dem Ethanol genommen und bei RT getrocknet. Aus den mittels Flüssigszintillationszählung ermittelten Zerfällen pro Minute errechnete sich die prozentuale Inkorporationsrate der Radionuklide nach:

$$\text{Gl. 10:} \quad \frac{\text{cpm [gereinigte Sonde]}}{\text{cpm [ungereinigte Sonde]}} \times 100 \% = \% \text{ Inkorporation}$$

3.14.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität einer radioaktiv markierten Sonde gibt einerseits Aufschluss über den Erfolg einer Markierungsreaktion und erlaubt andererseits eine gewisse Abschätzung über die Sensitivität einer Hybridisierungssonde. Eine spezifische Aktivität von $\geq 10^8 \text{ cpm} / \mu\text{g DNA}$ ist dabei anzustreben (MÜLHARDT, 2002).

Die spezifische Aktivität kann errechnet werden nach:

$$\text{Gl. 11:} \quad \frac{\text{Aktivität t[ger. Sonde]} \times \text{Verdünnung} \times \left(\frac{\text{Vol. [ger. Sonde]}}{\text{Vol. [unger. Sonde]}} \right)}{\text{eingesetzte DNA - Menge}} = \text{spezif. Aktivität t[cpm} / \mu\text{g DNA]}$$

3.15 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Um über sequenzhomologe Basenpaarungen spezifische DNA- oder RNA-Fragmente der auf Membranen übertragenen Nukleinsäuren nachweisen zu können, wurde mit radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert.

3.15.1 Hybridisierung von Plaquelifts

Pro Hybridisierungsrunde wurden zwanzig Nitrozellulosemembranen gemeinsam in einem Schüttelwasserbad hybridisiert. Vor Inkubation wurden die Membranen 5 min in 6 x SSC unter leichtem Schütteln angefeuchtet und anschließend einzeln sorgfältig in einer runden Dose mit Schraubverschluss in 50 ml vorgewärmtem Vorhybridisierungspuffer untergetaucht und 2 h bei 44°C inkubiert.

Vorhybridisierungslösung:

6 x		SSC
1 x		Denhardts-Lösung
0,5	%	SDS
100	µg/ml	Heringssperma-DNA
0,05	%	Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O
		sddH ₂ O

In der Zwischenzeit erfolgte die Markierung der Hybridisierungssonde. Nach Austausch des Vorhybridisierungspuffers durch 50 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung und Zusatz der Sonde wurde ebenfalls bei 44°C für die Dauer von 16 h hybridisiert.

Hybridisierungslösung:

6 x		SSC
1 x		Denhardts-Lösung
0,5	%	SDS
20	µg/ml	baker's yeast tRNA
0,05	%	Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O
		sddH ₂ O
		radioaktiv markierte Sonde

3.15.2 Waschen der Plaqueliftmembranen

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden-DNA erfolgten mehrere Waschschritte unter sukzessive zunehmender Stringenz. Steigerung von Temperatur und Dauer der Waschschritte bewirken eine Stringenzzunahme und damit eine zunehmende Abstoßung unspezifisch miteinander hybridisierender Nukleinsäurestränge. Zusätzlich führt eine Reduktion der Ionenstärke des Waschpuffers zu einer verminderten Abschirmung der Phosphatketten der Nukleinsäuren und fördert dadurch ebenfalls die Abstoßung unspezifischer Hybride. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Membranen nach Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit einzeln in die vortemperierte Waschlösung überführt.

Waschschritte:

1 x 30 min	6 x SSC / 0,05% Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O	~0°C (Eis-/Wassergemisch)
1 x 2 min	6 x SSC / 0,05% Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O	44°C
1 x 2 min	4 x SSC / 0,05% Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O	44°C
1 x 5 min	4 x SSC / 0,05% Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O	50°C
2 x 5 min	2 x SSC / 0,05% Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O	50°C

Das Waschen fand in einer dicht verschließbaren Frischhaltedose auf dem Schüttler oder im Schüttelwasserbad mit jeweils 300 ml Waschlösung statt. Das Ergebnis der Waschungen wurde zwischendurch mittels eines Kontaminationsmonitors überprüft und die Bedingungen entsprechend der Signalstärke variiert.

Nach Abschluss der Waschprozedur wurden die Membranen auf Whatman-Papier ausgelegt und bei RT getrocknet, um nachfolgend für die Autoradiografie vorbereitet zu werden.

3.15.3 Hybridisierung von Southernblots

Die Hybridisierung der immobilisierten DNA erfolgte je nach Membrangröße entweder in Glasröhren im Hybridisierungssofen oder in entsprechend dimensionierten Frischhaltedosen im Schüttelwasserbad. Vorbereitung, Vorhybridisierung und Hybridisierung der Southernblots fanden unter den gleichen Bedingungen statt wie die Hybridisierungen der Plaquelifts. Lediglich die Volumina der Lösungen wurden den neuen Erfordernissen angepasst, indem 1ml Vor- und Hybridisierungslösung pro 10 cm² Membranfläche eingesetzt wurde. Die Waschbedingungen konnten ebenfalls leicht modifiziert werden.

Waschschritte:

1 x 30 min	6 x SSC / 0,05% Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O	~0°C (Eis-/Wassergemisch)
1 x 5 min	4 x SSC / 0,05% Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O	50°C
2 x 5 min	2 x SSC / 0,05% Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O	50°C

War keine erneute Hybridisierung der Southernblots vorgesehen, wurden die Membranen wie im Falle der Koloniehybridisierung bei RT luftgetrocknet.

3.15.4 Hybridisierung von Northernblots

Zum Nachweis von Expressionssignalen mittels DNA-Sonden in Northernblots erfolgte die Hybridisierung in Glasröhren im Hybridisierungssofen. Die Membranen wurden zu diesem Zweck 5 min in 6 x SSC vorinkubiert, um im Anschluss vorhybridisiert zu werden. In Analogie zur Southernblothybridisierung erfolgte die Inkubation in 1ml Vorhybridisierungslösung pro 10 cm² Membranfläche.

3.15.4.1 Hybridisierung mit degeneriertem Oligo

Die Vorhybridisierung in Church-Puffer (CHURCH & GILBERT, 1984) fand bei einer Temperatur von 44°C statt. Nach 4 h und zwischenzeitlich erfolgter Markierung der DNA-Sonde konnte die Vorhybridisierungslösung durch vorgewärmten Hybridisierungspuffer ersetzt werden. Der Markierungsansatz wurde direkt in die Hybridisierungslösung pipettiert und die Inkubation über Nacht für weitere ca. 20 h bei 44°C fortgesetzt.

Vorhybridisierungs- / Hybridisierungslösung (Church-Puffer):

0,5 M	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ -Puffer, pH 7,2
1 mM	EDTA
7 %	SDS
1 %	BSA
	sddH ₂ O

3.15.4.2 Hybridisierung mit homologer Sonde

Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgten bei 42°C.

Vorhybridisierungslösung:

5 x	SSC
5 x	Denhardts-Lösung
50 %	Formamid
0,5 %	SDS
100	µg/ml salm sperm DNA
	sddH ₂ O

Wie im Falle des degenerierten Oligos wurde die Vorhybridisierung nach 4 Stunden beendet und die Lösung durch vorgewärmte Hybridisierungslösung ersetzt. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde erfolgte die 20-stündige Hybridisierung.

Hybridisierungslösung:

5 x	SSC
5 x	Denhardts-Lösung
50 %	Formamid
0,5 %	SDS
	sddH ₂ O
	radioaktiv markierte Sonde

3.15.5 Waschen der Northernblots

Die Membranen wurden vorsichtig aus der Hybridisierungsröhre herausgenommen und in eine Frischhaltedose mit 150-200 ml vorgewärmter Waschlösung überführt. Durch Wahl der geeigneten Waschbedingungen sollte auch hier eine größtmögliche Spezifität der Hybridisierung und ein optimales Signal- / Hintergrund-Verhältnis erzielt werden. Die Waschlösungen wurden jeweils vorsichtig abgegossen und ersetzt. Da weitere Hybridisierungen vorgesehen waren, wurden die Northernblotmembranen nach dem Waschen feucht in Frischhaltefolie eingepackt, in Plastikbeutel eingeschweißt und sofort zur Röntgenfilmmexposition eingesetzt. Die Lagerung der radioaktiven Membranen erfolgte bis zum „strippen“ bei -20 oder -70 °C.

3.15.5.1 Blot mit degeneriertem Oligo

Waschbedingungen:

1 x 30 min	6 x	SSC / 0,05% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	~0°C (Eis-/Wassergemisch)
1 x 20 min	4 x	SSC / 0,05% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	RT
1 x 10 min	4 x	SSC / 0,05% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	44°C

3.15.5.2 Blot mit homologer Sonde

Waschbedingungen:

1 x 15 min	2 x	SSC / 0,1% SDS	RT
2 x 15 min	2 x	SSC / 0,1% SDS	42°C
1 x 5 min	0,5 x	SSC / 0,1% SDS	42°C
1 x 5 min	0,1 x	SSC / 0,1% SDS	60°C

3.15.6 Strippen von Northernblots

Auf Membranen immobilisierte Nukleinsäuren können wiederholt mehrfach mit verschiedenen Sonden hybridisiert werden. Dazu war es erforderlich, dass die vorhergehende Hybridisierung revertiert und durch geeignete Waschmaßnahmen die Sonde vollständig entfernt wurde. Dies konnte durch maximale Erhöhung der Washtemperatur, vollständige Reduktion der Ionenstärke, sowie durch Variation der Waschzeit und der Anzahl der Waschschrte erzielt werden. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Signalstärke mit einem Kontaminationsdetektor überprüft. Zum Strippen der Northernblots wurde 0,1% SDS / ddH_2O aufgeköcht, dieses über

die Membranen gegossen und 15-20 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Das Waschen wurde zweimal wiederholt, bis die Signalstärke nicht mehr vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden war. Die Membranen konnten nun erneut hybridisiert oder feucht in Folie eingeschweißt bei -20 oder -70°C aufbewahrt werden.

3.16 Nachweis der Hybridisierungssignale

Die durch Hybridisierung mit Sonden-DNA radioaktiv markierten Nukleinsäuren konnten mittels Röntgenfilmexposition dokumentiert werden. Die in Frischhaltefolie eingepackten Membranen wurden in mit Verstärkerfolien (Intensifying screens) ausgestattete Autoradiografiekassetten gelegt. In der Dunkelkammer wurde der Autoradiografiefilm zwischen Membran und Verstärkerfolie positioniert. Die Verwendung der Verstärkerfolie bewirkt eine Signalverstärkung und eine Reduktion der Expositionsdauer. Strahlung, die durch den Röntgenfilm hindurchtritt, trifft auf die Verstärkerfolie und regt dort Phosphoratome zur Emission von Photonen an, die ihrerseits wieder zur Schwärzung des Röntgenfilmes beitragen. Die Expositionsdauer bei -70°C variierte zwischen einem und mehreren Tagen. Nach Beendigung der Exposition wurde die Kassette bei RT aufgetaut, in der Dunkelkammer der Film zunächst 3 min in Entwickler unter leichtem Schwenken inkubiert und dann die Reaktion durch mehrere Sekunden langes Eintauchen in Stopplösung (Wasser mit einem Schuss 100%ige Essigsäure) beendet. Nach einem Bad in Fixierer für 10 min konnte der Film anschließend etwa 20-30 min gewässert und danach luftgetrocknet werden.

3.17 Klonierung von DNA

3.17.1 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen können Schnittstellen in doppelsträngiger DNA anhand ihrer enzymspezifischen Sequenz erkennen und die palindromische Zielsequenz spezifisch schneiden. Sie wurden daher auch für die Charakterisierung von DNA-Fragmenten und für Vektorklonierungen eingesetzt.

Folgende Restriktionsenzyme fanden Verwendung (alle von MBI-Fermentas; St.Leon-Rot):

*Bam*HI, *Pst*I, *Msp*I, *Sac*I, *Spe*I, *Xba*I, *Xho*I

3.17.1.1 Restriktion von Plasmid-DNA

Die Restriktion von plasmidärer DNA erfolgte in der Regel in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Pro µg DNA wurden zwei Enzymeinheiten (U) zugesetzt. Neben der Zugabe von 1/10 Vol. enzymespezifischem 10 x Reaktionspuffer wurde das Reaktionsvolumen durch ddH₂O ergänzt. Die Inkubation fand bei 37°C für mindestens 1h statt. Der Reaktionsansatz konnte nach Zugabe von 1/6 Vol. 6 x Probenpuffer sofort elektrophoretisch aufgetrennt werden. Im Falle von Doppelverdauen war darauf zu achten, dass durch Wahl der geeigneten Reaktionspuffer optimale Bedingungen für beide Restriktionsenzyme vorlagen.

3.17.1.2 Restriktion hochmolekularer genomischer DNA

Für die Restriktion von hochmolekularer genomischer DNA aus *Phycomyces blakesleeanus* wurden etwa 5-10 U Enzym / µg DNA eingesetzt, da die DNA in stark verdrillter Struktur vorliegen kann und daher für Restriktionsenzyme schwerer zugänglich ist. Die Reaktionsdauer wurde auf mindestens 5 Stunden ausgedehnt.

3.17.2 Ligation von DNA

Um DNA-Fragmente aus Restriktionsanalysen amplifizieren zu können, wurden sie zunächst in geeignete Plasmidvektoren ligiert. Damit transformierte Bakterienstämme ließen sich dann bei Bedarf unbegrenzt vermehren. Zur Vermeidung eines Übermaßes an Rezirkularisationen des Vektors und nicht rekombinanter Klone sollte die Insert-DNA im Ligationsansatz stets im molaren Überschuss vorliegen. In der Regel wurden Insert und Vektor im Verhältnis 3:1-5:1 eingesetzt.

3.17.2.1 Linearisieren des Plasmid-Vektors

Bevor Fremd-DNA in einen Plasmidvektor ligiert werden konnte, musste dieser zunächst linearisiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Plasmid-DNA in der Regel mit dem gleichen Enzym geschnitten, mit dem auch die Fremd-DNA restringiert wurde. Zur Verhinderung von

Rezirkularisationen des Vektors wurde dieser zusätzlich dephosphoryliert. Eine alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse der 5'-Phosphatreste. Dadurch wird eine Religation der Vektorenden unterbunden.

Plasmidäre Vektor-DNA wurde nach der Restriktion mit dem entsprechenden Enzym direkt der Dephosphorylierungsreaktion unterzogen.

Reaktionsansatz:

2-5 U	Shrimp Alkaline Phosphatase (Amersham Biosciences Europe; Freiburg)
1/10 Vol.	10x Reaktionspuffer sddH ₂ O

Die Dephosphorylierung erfolgte durch Inkubation bei 37°C für eine weitere Stunde. Nach Inaktivierung der Phosphatase für 15 min bei 65°C konnte der Vektor elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und für Ligationsexperimente verwendet werden.

3.17.2.2 Ligation nach Standardbedingungen

Die Ligation von Fremd-DNA und Plasmidvektor mit „langen“ kohäsiven Enden, also solchen mit einem 4-Basen-Überhang, wie sie von den meisten der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme produziert werden, konnte nach dem Standardprotokoll durchgeführt werden.

Standardligationsansatz (20µl):

x	µl	Vektor (50-100 ng)
0,5	µl	T4 DNA Ligase (2,5U)
2	µl	10x Ligationspuffer
x	µl	Insert-DNA
x	µl	sddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde 3 h bei 22°C im Wasserbad inkubiert. Um die Ligase zu inaktivieren, wurde das Reaktionsgemisch direkt im Anschluss noch einmal 10 min auf 65°C erhitzt. Der Ligationsansatz konnte nun in Transformationsexperimenten eingesetzt werden. In der Regel genügten 1-5 µl des Ligationsgemisches.

3.17.2.3 Ligation kurzer kompatibler Enden

Entstehen durch Restriktion mit verschiedenen Enzymen gleiche Enden, so spricht man von kompatiblen Enden. Da es sich hier um kompatible Enden mit nur 2 Basen Überhang handelte, wurde die Ligationsreaktion mit einem Temperaturgradienten durchgeführt. So konnte gewährleistet werden, dass sich im Verlaufe des Gradienten die für das Aneinanderlagern der kurzen DNA-Enden günstigsten thermodynamischen Bedingungen ergeben. Dazu wurde der Reaktionsansatz (siehe 3.17.2.2) über Nacht in einem Eis-Wasser-Gemisch inkubiert und dieses offen bei RT gelagert. Die weitere Behandlung entsprach der Standardligation (3.17.2.2).

3.18 Transformation von Bakterien

Um Plasmid-DNA für weitere Untersuchungen in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen, wurde diese mittels geeigneter Bakterien vermehrt. Dazu musste die Plasmid-DNA durch Transformation von den Bakterien aufgenommen werden. Die Aufnahme fremder DNA wurde durch die Behandlung der Bakterien mit CaCl_2 induziert.

3.18.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Mit 3 ml einer Bakterienübernachtskultur wurden 25 ml LB-Medium inokuliert und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach 7-8 Stunden Wachstum und anschließender Bestimmung der OD_{600} konnten damit wiederum 500 ml LB-Medium angeimpft werden. Die Ausgangs- OD_{600} wurde auf 0,08 eingestellt und die Kultur bei 18°C über Nacht unter sanftem Rühren angezogen. Unter diesen Bedingungen teilten sich die Bakterien etwa alle 6 Stunden, so dass nach ca. 18 Stunden die gewünschte OD_{600} von etwa 0,6 erreicht war. Während der weiteren Behandlung erfolgte die Lagerung der Bakterien auf Eis, da sie empfindlich gegenüber Erwärmung waren und evtl. daraus geringere Transformationsraten resultierten. Die Bakterienkultur wurde zunächst 10 min auf Eis inkubiert, bevor sie dann 10 min bei 2500 x g und 4°C pelletiert werden konnte. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte das Resuspendieren des Pellets in 40 ml eiskaltem TB und eine weitere 10minütige Inkubation auf Eis. Ein zweiter Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wie zuvor schloss sich an, um das Pellet dann in 9,3 ml eiskaltem TB und 0,7 ml DMSO aufnehmen zu können. Nach einer dritten Inkubation auf Eis für 10 min wurde die

Bakteriensuspension in 200 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C dauerhaft gelagert.

3.18.2 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

100 µl der langsam auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien wurden mit 1-5 µl eines Ligationsansatzes oder einer Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert, dann für 2 min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und anschließend für weitere 3 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium und nachfolgender einstündiger 37°C-Inkubation unter mäßigem Schütteln wurden die Bakterien 2 min bei 13000 x g und RT pelletiert und der Überstand verworfen. Resuspendiert in 100 µl frischem LB konnten die Bakterien auf LB/Ampicillin-Platten ausplattiert werden.

3.18.3 Selektion

Zur Überprüfung der Aufnahme von Fremd-DNA in das Plasmid und der erfolgreichen Transformation kompetenter Bakterien diente vor allem die Kombination zweier Selektionsverfahren.

3.18.3.1 Antibiotikaresistenz

Neben dem Replikationsstartpunkt (*origin of replication, ori*) und der Klonierungsstelle (*multiple cloning site, mcs*) besitzt ein Plasmid mindestens noch ein Selektionsgen, meist ein Antibiotikaresistenzgen. Der hier verwendete Vektor besitzt ein Resistenzgen gegen Ampicillin, welches sich teilende Bakterienzellen tötet. In ampicillinhaltigem Medium können sich also nur solche Bakterien vermehren, die mit einem Antibiotikaresistenzgen tragenden Plasmid transformiert worden sind.

3.18.3.2 Blau-Weiß-Selektion

Um festzustellen, ob Fremd-DNA in einen Vektor aufgenommen worden ist, dient als weiterer Schritt die Blau-Weiß-Selektion. Die Klonierungsstelle liegt in einem Gen, dass durch Aufnahme eines DNA-Fragmentes inaktiviert wird. Im Falle der Blau-Weiß-Selektion wird das lacZ'-Gen unterbrochen. LacZ' kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase, das alleine keine β -Galactosidase-Aktivität besitzt. Erst durch die Verwendung passender Bakterienstämme, die auf ihrem Genom für den ebenfalls inaktiven C-terminalen ω -Abschnitt der β -Galactosidase codieren, wird die β -Galactosidase funktionsfähig – ein Vorgang, der als α -Komplementation bezeichnet wird. In Gegenwart des Farbstoffes x-Gal und dem Induktor IPTG kommt es zur Bildung blauer Kolonien. Wird das Leseraster des lacZ-Gens durch Insertion von Fremd-DNA zerstört, unterbleibt die Blaufärbung der Kolonien. So lassen sich anhand der weißen Kolonien die Transformanten selektieren.

3.19 Nukleinsäure-Sequenzierung

Die auf dem von Sanger entwickelten Kettenabbruchverfahren basierende Sequenzierung der DNA-Klone aus *Phycomyces blakesleeana* erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. U. Maier mit Hilfe eines Sequenzierautomaten (LiCOR4200, MWG, Ebersberg)

3.19.1 Probenvorbereitung

Die zu sequenzierende DNA-Lösung wurde nach der Konzentrationsbestimmung 5 min mit 13000 x g bei RT zentrifugiert, ein entsprechendes Aliquot vorsichtig abgenommen und mit sddH₂O auf 1 µg/12 µl eingestellt und im Kühlschrank gelagert.

3.19.2 Computergestützte Sequenzanalyse

Editierung von Sequenzierungsrohdaten

Chromas 1.45; McCarthy, C.; School of Biomolecular and Biomedical Science, Faculty of Science and Technology, Griffith University, Brisbane, Queensland, Australia;
<http://trishul.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html>

Sequenzvergleiche

ClustalX 1.81

Globale Sequenzvergleiche

National Center of Biotechnology Information, USA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=0>

ExPASy Molecular Biology Server; Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Basel, Schweiz

<http://www.expasy.org/>

Berechnung von Molekulargewicht und Oligonukleotidlänge

<http://www.promega.com/biomath/calc09.htm>

3.20 Elektrophorese von Proteinen

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Durch Inkubation der Proteine mit SDS und Disulfidbrücken-reduzierenden Mitteln werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine; die stark negative Ladung des SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine, so dass in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen sind und im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht basiert auf dem Siebeffekt der Trennmatrix, dem Polyacrylamid. Dieses setzt sich aus Acrylamid und dem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid zusammen, deren Konzentration die Porengröße der Matrix und damit den Trennbereich für die Proteine bestimmt. Die Proteine werden ansteigend nach ihrer Größe aufgetrennt. Die diskontinuierliche SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Das relativ niedrig konzentrierte Sammelgel dient der Konzentrierung der Probe und damit einer höheren Bandenschärfe.

3.20.1 Vorbereiten des Gels

Es wurden Trenngele zwischen 10 und 12 % hergestellt, wobei die Sammelgele stets 5 % Acrylamid enthielten. Die Polymerisation des Polyacrylamid wurde durch Zugabe von Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter eingeleitet. Zwischen zwei mit einer Gummidichtung und Klammern seitlich und unten

verschlossenen Glasplatten (85 x 80 x 1 mm) wurde mittels Pasteurpipette zügig die Trenngellösung luftblasenfrei eingefüllt und sofort mit sddH_2O gesättigtem Butanol überschichtet, um einerseits die Hemmung der Polymerisation an der Oberfläche zu verhindern und andererseits eine scharfe Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu erzielen. Nach Polymerisation (ca. 30-45 min) konnte die Überschichtungsflüssigkeit sorgfältig mit Saugpapier entfernt und die Geloberfläche mit sddH_2O gespült werden. Danach wurde die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und sofort der Probenkamm sorgfältig eingefügt. Nach weiteren 45 min Polymerisation konnte das Gel für die Elektrophorese verwendet werden.

10 x Elektrophoresepuffer:

250 mM Tris
1,9 M Glycin
1 % SDS

3 x Trenngelpuffer:

1,125 M Tris•Cl pH 8,8
0,3 % SDS

2 x Sammelgelpuffer:

250 mM Tris•Cl pH 6,8
0,2 % SDS

4 x Probenpuffer (verändert):

0,5 M Tris•Cl pH 6,8
8 % SDS
25 % Saccharose
0,04% Bromphenolblau
80 mM DTT

Acrylamid-/Bisacrylamid- Stammlösung:

24 % Acrylamid
0,75 % N,N'-Methylenbisacrylamid

	Trenngel		Sammelgel
	12%	10%	5%
Acrylamid/Bisacrylamid	15 ml	12,5 ml	2 ml
Trenngelpuffer	10 ml	10 ml	—
Sammelgelpuffer	—	—	5 ml
sddH ₂ O	4,9 ml	7,4 ml	—
APS (30 %)	10 µl	10 µl	10 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Tab. 2

Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für eine SDS-PAGE.

3.20.2 Vorbereiten der Proben

Die Proben wurden mit $\frac{1}{4}$ Volumen 4 x Probenpuffer versetzt und im Wasserbad 3 min aufgeköcht und anschließend eventuell noch vorhandenes unlösliches Material 5 min mit 10000 x g bei RT abzentrifugiert.

3.20.3 Durchführung der Elektrophorese

Nach Entfernen von Kamm und Dichtung wurde das Gel mit den Glasplatten in die vertikale Elektrophoreseanlage (Abb. 25) eingespannt und die Pufferreservoirs mit 1 x Elektrophoresepuffer luftblasenfrei gefüllt. Die Spannung wurde im Bereich des Sammelgels auf 85 V bei 15 mA eingestellt und erst nach Erreichen der Trenngelfront auf 100 V gesteigert. Die Elektrophorese wurde so lange durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht hatte.

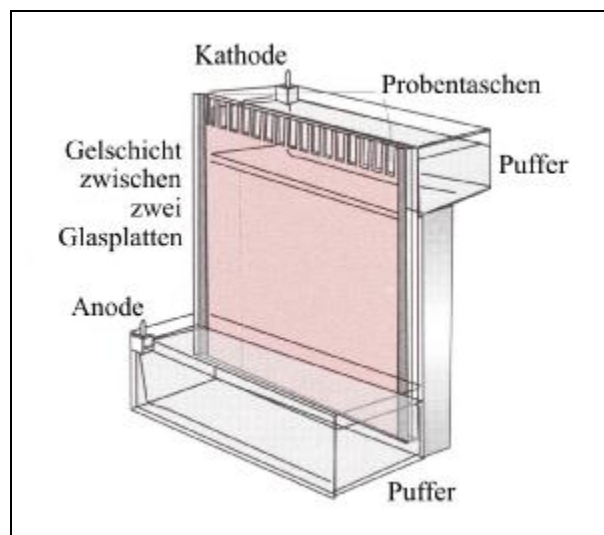


Abb. 25

Prinzipdarstellung einer vertikalen Flachgel-Apparatur nach STUDIER (1973)
(aus: LOTTSPREICH / ZORBAS (1998), verändert).

3.20.4 Fotografische Dokumentation

Die mit Coomassie-Brillantblau oder durch Silberimprägnierung gefärbten Gele konnten im feuchten Zustand oder getrocknet im Durchlicht oder im Auflicht fotografiert werden.

3.21 Protein-Nachweismethoden

3.21.1 Protein-Konzentrationsbestimmung (Amidoschwarz-Methode)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration fand die Amidoschwarz-Methode nach POPOV et al.(1975) Verwendung. Ein Volumen Proteinelösung (mind. 200 µl) wurde mit 4 Volumen Färbelösung versetzt und 15 min bei RT mit 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Waschlösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der Überstand abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Nach Resuspension in 250 µl 0,2M NaOH erfolgte die Bestimmung der OD bei 615 nm. Anhand einer Eichkurve mit BSA als Referenz konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Färbelösung:

10	%	Essigsäure
90	%	Methanol
0,1	%	Amidoschwarz

Waschlösung:

10	%	Essigsäure
90	%	Methanol

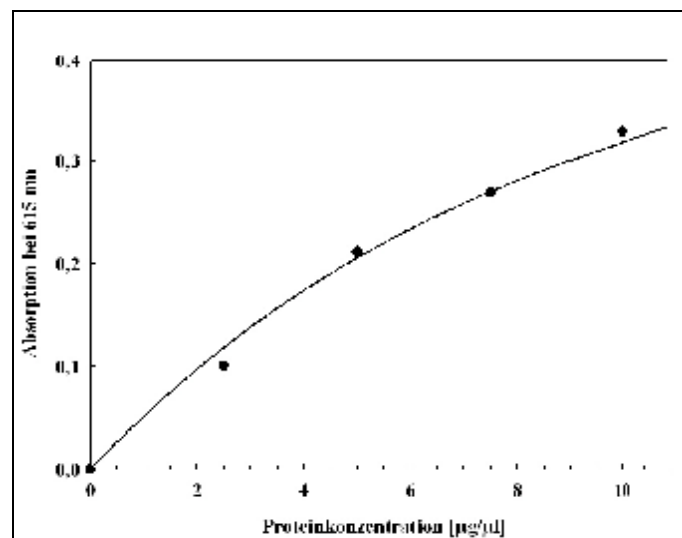


Abb. 26

Eichkurve zur Amidoschwarz-Proteinbestimmung; $y = 0,5404 \left(1 - \left(e^{-0,1227x} \right) \right)$.

3.21.2 Protein-Konzentrationsbestimmung (CBQCA-Methode)

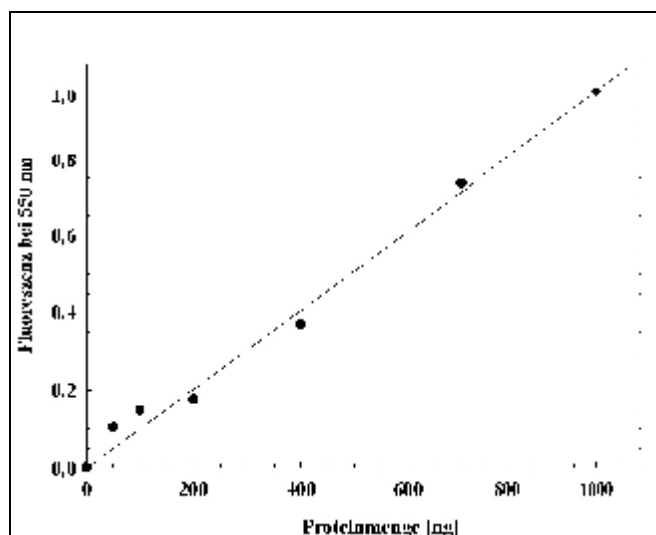


Abb. 27

Eichgerade zur CBQCA-Proteinbestimmung; $y = 0,0008x$.

Um im Rahmen der Bindungsexperimente quantitative Aussagen über die gebundene Riboflavinmenge an die Proteinkristalle zu treffen, wurde aufgrund der geringen Proteinmengen die sensitive Bestimmungsmethode mit CBQCA (YOU et al, 1997) notwendig. CBQCA (3-(-4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxyaldehyde) fluoresziert in wässriger Lösung nicht, bildet aber in Anwesenheit von Cyanid durch Reaktion mit primären Aminosäuren fluoreszierende Derivate (Produktinformation CBQCA). Das Kristallpellet wurde in 30 μ l Denaturierungslösung in einem Reaktionsgefäß in kochendem Wasser denaturiert. 5 μ l der denaturierten Probe wurden dann mit 130 μ l Natriumboratpuffer gemischt, anschließend 5 μ l 20 mM KCN zugegeben und die Reaktion durch Zusatz von 10 μ l CBQCA gestartet. Zur Kontrolle wurde im Ansatz die Probe durch Boratpuffer ersetzt. Nach 75 min Dunkelinkubation bei RT konnte nach Anregung bei 465 nm die Fluoreszenzemission bei 550 nm gemessen. Anhand der Fluoreszenzwerte und Steigung der mit einer BSA-Verdünnungsreihe erstellten Eichgerade (Abb. 27) konnte die Proteinmenge nach Gleichung 12 errechnet werden.

Denaturierungslösung:

0,5 % SDS
5 mM DTT
ddH₂O

Natriumboratpuffer:

0,1 M Na₂B₄O₇ • 10 H₂O
→ pH 9,3

Eichstammlösung:

0,4 % BSA
0,1 M Natriumboratpuffer

Gl. 12:
$$\text{Proteinmenge [ng]} = \left(\frac{(\text{Emission}_{550 \text{ Probe}} - \text{Emission}_{550 \text{ Kontrolle}})}{0,0008} \right)$$

3.21.3 Coomassiefärbung der Gele

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine konnten durch Anfärben mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden. Verwendung fand eine kolloidale Färbemethode (ECKERT u. KARTENBECK, 1997). Coomassie-Brilliantblau G-250 besitzt unter sauren Bedingungen eine reduzierte Löslichkeit und es kann als kolloidale Dispersion auf das Gel aufgebracht werden. Während der gelöste Anteil zur Proteinanfärbung führt, kann der größte Teil des kolloidalen Farbstoffes nicht in das Gel eindringen, wodurch eine fast hintergrundfreie Anfärbung entsteht. Das Gel wurde eine Stunde in 200 ml 12 % Trichloressigsäure fixiert und anschließend über Nacht in der Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Anfärben konnte das Gel kurz in 25 % Methanol gespült und nachfolgend zur Fixierung und Stabilisierung des Protein-Farbstoffkomplexes in 20 % Ammoniumsulfatlösung aufbewahrt werden.

Färbelösung:

0,1 %	Serva Blue G
2 %	H ₃ PO ₄
10 %	(NH ₄) ₂ SO ₄

3.21.4 Silberimprägnierung der Gele

Die Silberimprägnierung der Gele erfolgte nach der von BLUM et al.(1987) beschriebenen Methode und diente aufgrund ihrer größeren Sensitivität der Überprüfung der Coomassiefärbung. Da die Proteine bei der vorhergehenden Coomassiefärbung bereits fixiert wurden, konnte dieser Schritt bei der Silberimprägnierung entfallen. Die Gele wurden 3 x 20 min in 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend 1 min in 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 20 Sekunden in aq. bidest. erfolgte die Behandlung mit Imprägnierungslösung für 20 min im Dunkeln. Nach 2 x 20 Sekunden Waschen mit ddH₂O wurden die Silberkomplexe entwickelt und dieser Prozess, sobald die Banden gut sichtbar waren, durch Überführen des Gels in Stopplösung beendet.

Imprägnierungslösung:

0,2	%	Silbernitrat
75	µl	Formaldehyd

Entwickler:

0,6	%	Natriumcarbonat
0,0004	%	Natriumthiosulfat
50	µl	Formaldehyd

Stopplösung:

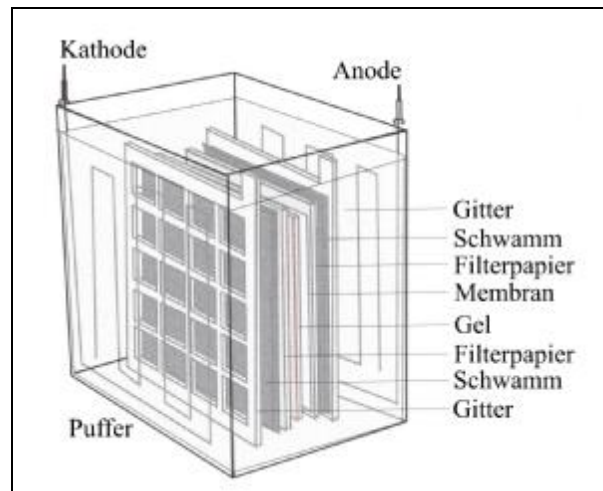
50	%	Ethanol
12	%	Essigsäure

3.22 Blotting von Proteinen

Um Proteine sequenzieren zu können, mussten sie zuvor auf einer Membran immobilisiert werden. Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte nach dem Westernblot-Verfahren mit Hilfe einer Tankblotanlage (Abb. 28). Das Gel wurde aus der Elektrophoreseapparatur entnommen, das Sammelgel entfernt und die Orientierung durch Abschneiden einer Ecke markiert. Anschließend wurde das Gel 15 min in Transferpuffer äquilibriert. In der Zwischenzeit wurde eine PVDF-Membran (Boehringer, Mannheim) 1-3 Sekunden mit 100 % Methanol benetzt und danach 1-2 min in ddH_2O unter leichtem Schütteln gewaschen. Zur Entfernung des Wassers erfolgt eine mehrminütige Inkubation in Transferpuffer. Der Sandwich-Aufbau von Gel, Membran, Whatman-Papier, Schwamm und Gitterplatte erfolgte luftblasenfrei analog der untenstehenden Abbildung. Der Tank wurde mit Transferpuffer gefüllt und der Transfer über Nacht bei $7-7,5 \text{ Vcm}^{-1}$ und 180 mA durchgeführt.

Transferpuffer:

48	mM	Tris
39	mM	Glycin
0,0375	%	SDS
20	%	Methanol

**Abb. 28**

Aufbau einer Tankblot-Anlage nach BITTNER et al.(1980) (aus: LOTTSPEICH / ZORBAS (1998), verändert).

3.23 Proteinsequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung der Proteine nach dem Prinzip des Edman-Abbaus wurde am Biochemischen Institut am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Giessen von Herrn Dr. D. Linder durchgeführt.

3.23.1 Vorbereiten der Proteine für die Sequenzierung

Nach Beendigung des Western-Transfers wurde die Position des Gels auf der Membran markiert. Um die Proteinbanden aus der PVDF-Membran ausschneiden zu können, mussten diese durch Anfärben mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die Membran 3 Sekunden in 100 % Methanol gespült, 10 Sekunden in der Färbelösung inkubiert und danach mit 50 % Methanol kurz entfärbt. Nach dem Ausschneiden der Banden mit einem Skalpell mussten diese 3 x 10 min in 1 l ddH₂O gründlich gewässert und bis zur Sequenzierung feucht in einem Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert werden.

Färbelösung:

0,1	%	Serva Blue R
40	%	Methanol
1	%	Essigsäure

3.24 Physiologische Experimente

Ob die Anwesenheit von oktaedrischen Proteinkristallen Unterschiede in der Reaktion auf einen gravitropen Reiz bewirkt, sollte in physiologischen Experimenten überprüft werden.

3.24.1 Zentrifugation

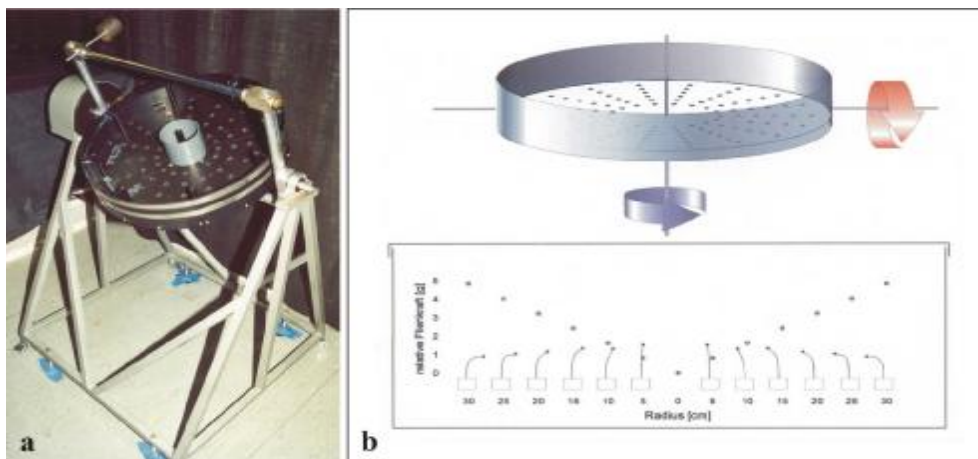


Abb. 29

a) Originalabbildung der Zentrifuge (eigene Aufnahme); **b)** Prinzipdarstellung: Oben: Drehbewegungen des Zentrifugentellers: Rotation des Zentrifugentellers (blau); Drehbewegung des gesamten Systems um horizontale Achse zur Klinostatisierung (rot; optional; in der vorliegenden Arbeit nicht angewandt) Unten: Querschnitt durch Zentrifugenteller mit Darstellung der Abhängigkeit der relativen Fliehkraft vom Radius (verändert nach FINGER, 2000).

Zur Untersuchung der durch einen gravitropischen Reiz induzierten Sporangiphorenbeugung diente eine von der Institutswerkstatt konstruierte Zentrifuge. Mit ihr ließ sich in Abhängigkeit von Radius und Drehzahl die Zentrifugalkraft und damit der künstliche gravitrope Stimulus variieren. Die Zentrifuge mit einem Durchmesser von 65 cm erlaubte Drehbewegungen um die in Abb. 29b dargestellten Achsen. Im Zentrifugenteller sind in konzentrischen Kreisen Bohrungen radial im Abstand von jeweils 5 cm angeordnet. Der Abstand wurde so gewählt, dass eine Ausweichreaktion (avoidance response, CAMPUZANO et al., 1996) der Sporangiphoren unterbleibt. Zusätzlich konnten noch radial Trennwände zur Vermeidung von Turbulenzen eingelassen werden. Mittels eines aufschraubbaren Deckels konnte die Zentrifuge licht- und luftdicht verschlossen werden. Die Berechnung der erforderlichen Umdrehungszahl folgte Gleichung 13.

$$\text{Gl. 13: Umdrehungszahl} \quad U_{\text{sec}^{-1}} = \sqrt{\frac{\text{rel. Fliehkraft}[\times g]}{4,024 \times r}}$$

3.24.1.1 Kontrollen zur gravitropischen Reizung

In früheren Experimenten (MEIER, 2001) hat sich gezeigt, dass die Sporangioophoren von *Phycomyces blakesleeanus* auch ohne gravitrope Reizung eine Beugung aufweisen. Daher erfolgte zur Kontrolle parallel zu den Experimenten in der Zentrifuge eine Überprüfung von Sporangioophoren, die für die Versuchsdauer vertikal in einer lichtdichten Kiste im gleichen Raum aufbewahrt und nicht einer vom Erdschwerefeld verschiedenen gravitropen Reizung unterzogen wurden.

3.24.2 Balancebox

Ob Licht eine Modulation der gravitropischen Reaktion in Abhängigkeit vom Vorhandensein oktaedrischer Proteinkristalle hervorruft, wurde mit Hilfe einer sogenannten Balancebox untersucht. Es handelte sich hierbei um eine schwarze, lichtdichte Kiste mit den Abmessungen 130 x 40 x 17 cm, an deren kurzen, gegenüberliegenden Seiten je ein Diaprojektor zur Bestrahlung installiert war. In der Mitte der Kiste ließen sich rechtwinklig zum Strahlengang Vials mit Einzelsporangioophoren horizontal (Inklinationswinkel $\gamma = 90^\circ$) anordnen.



Abb. 30
Originalabbildung der Balancebox zur tonischen Bestrahlung.

3.24.2.1 Tonische Bestrahlung

Mit Hilfe der Balancebox konnte zusätzlich zum gravitropen Stimulus eine beidseitige gleichmäßige Bestrahlung der Sporangiothoren erreicht werden. Diese tonische Bestrahlung verhinderte einen Lichtintensitätsgradienten, der zu einer phototropischen Reaktion führen würde.

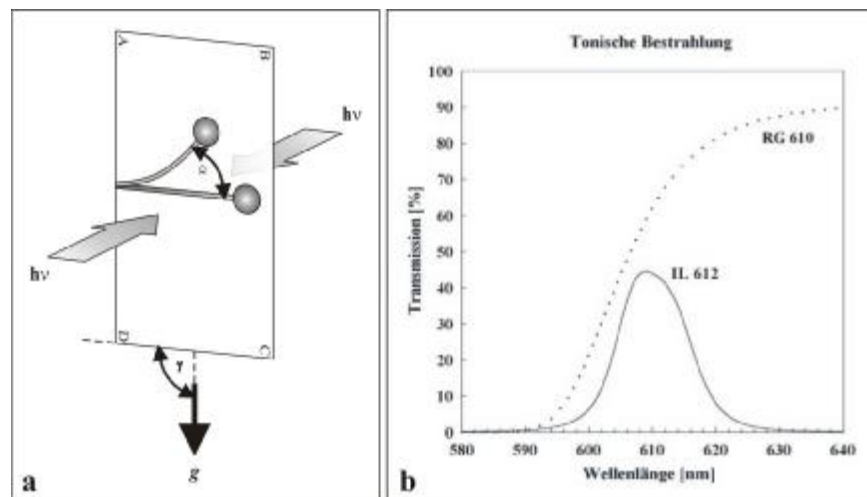


Abb. 31

a) Bei der tonischen Bestrahlung wird die horizontal ausgerichtete Sporangiothore (Inklinationswinkel $\gamma = 90^\circ$) beidseitig gleichmäßig mit Rotlicht der Wellenlänge 612 nm bestrahlt (10^{-8} W/m^2 und $0,5 \text{ W/m}^2$), das aus der Kombination eines Kantenfilters RG610 mit einem Interferenzlinienfilter IL612 resultiert (**b**).

Die Lichtintensität wurde so eingestellt, dass beide Lichtquellen jeweils die Hälfte einstrahlten. Im Strahlengang der Projektoren befanden sich neben einem Wärmeschutzfilter ein Interferenzlinienfilter der Wellenlänge 612 nm in Kombination mit einem Kantenfilter RG 610. Zur Voreinstellung der Lichtintensitäten wurden verschiedene Neutralglasfilter kombiniert. Die Feineinstellung mit einem Potentiometer konnte unter Kontrolle durch eine Photodiode mit angeschlossenem Mikrovoltmeter erfolgen.

3.24.2.2 Kontrollen zur tonischen Bestrahlung

Analog der Kontrollexperimente zu den Zentrifugenversuchen erfolgten auch Kontrollen der tonischen Bestrahlung. In einer separaten lichtdichten Kiste wurden Sporangiothoren wie in der Balancebox mit einem Inklinationswinkel γ von 90° horizontal gelagert. Dies diente der Überprüfung der Beugung ohne eine tonische Bestrahlung.

3.24.3 Calcium-Versuche

Calcium wird als bedeutendes Glied in der Signaltransduktionskette zahlreicher physiologischer Prozesse diskutiert.

Zur Überprüfung, ob in Anwesenheit der oktaedrischen Kristalle von *Phycomyces blakesleeana* calciumabhängige Unterschiede im Längenwachstum und in der gravitropischen Beugungsreaktion auftreten, wurden die beiden Stämme *MR74* und *MR77*, von denen angenommen wird, dass sie isogen sind, vergleichend untersucht. Vor und nach der fünfstündigen Versuchsphase erfolgte die Längenbestimmung der Einzelsporangiophoren, sowie die Bestimmung des gravitropen Beugungswinkels am Versuchsende.

3.24.3.1 Inkubation der Sporangiohoren

Die Lagerung der Einzelsporangiophoren während der Versuche erfolgte submers im Inkubationsmedium in lichtdichten schwarzen Kisten. Die Ausrichtung der Vials mit den Einzelsporangiophoren für die gravitrope Beugungsreaktion erfolgte mit einem Inklinationswinkel γ von 90° (vgl. Abschn. 3.24.2). Zur Überprüfung des Längenwachstums verblieben die Vials vertikal in ihren Ständern. Um eine optimale Ca^{2+} -Versorgung der Sporangiohoren zu gewährleisten, wurden sie in sogenanntem „artificial pond water“ (APW) inkubiert. Das APW war mit der jeweils benötigten Ca^{2+} -Konzentration angereichert.

Das Inkubationsmedium für die Kontrollen enthielt alle Zusätze bis auf das Ca^{2+} . Der Zusatz von Calcium erfolgte gemäß Tab. 3. Die zugesetzte Menge EGTA blieb stets gleich. Aufgrund der Komplexbildner-Eigenschaften des EGTA veränderte sich die Konzentration freien Calciums im Medium während der Versuchsdauer nicht (vgl. Russ *et al.*, 1991).

„artificial pond water“

1	mM	MES
0,1	mM	KCl
1	mM	NaCl
→ pH 6,0		

Ca ²⁺ -Konzentration [M]	eingesetztes Ca ²⁺ [M]	freies EGTA [M]	eingesetztes EGTA [M]
1 x 10 ⁻¹³	8,9 x 10 ⁻¹²	2,999 x 10 ⁻³	3 x 10 ⁻³
1 x 10 ⁻¹²	8,9 x 10 ⁻¹¹	2,999 x 10 ⁻³	"
1 x 10 ⁻¹¹	8,9 x 10 ⁻¹⁰	2,999 x 10 ⁻³	"
1 x 10 ⁻¹⁰	8,9 x 10 ⁻⁹	2,999 x 10 ⁻³	"
1 x 10 ⁻⁹	8,9 x 10 ⁻⁸	2,999 x 10 ⁻³	"
1 x 10 ⁻⁸	8,9 x 10 ⁻⁷	2,998 x 10 ⁻³	"
1 x 10 ⁻⁷	1 x 10 ⁻⁵	2,989 x 10 ⁻³	"
1 x 10 ⁻⁶	7,5 x 10 ⁻⁵	2,925 x 10 ⁻³	"
1 x 10 ⁻⁵	6 x 10 ⁻⁴	2,408 x 10 ⁻³	"
1,4 x 10 ⁻⁵	7,5 x 10 ⁻⁴	2,26 x 10 ⁻³	"
1 x 10 ⁻⁴	2,25 x 10 ⁻⁴	8,37 x 10 ⁻⁴	"
1 x 10 ⁻³	3,9 x 10 ⁻³	9,85 x 10 ⁻⁵	"

Tab.3

Konzentrationen von zugesetztem Ca²⁺ und EGTA. Die Konzentration des zugesetzten EGTA blieb gleich. Die gewünschte Ca²⁺-Konzentration konnte durch entsprechenden Zusatz eingestellt werden. Durch die komplexbildenden Eigenschaften von EGTA ergaben sich konstante Ca²⁺-Konzentration im Medium.

3.24.4 Auswertung

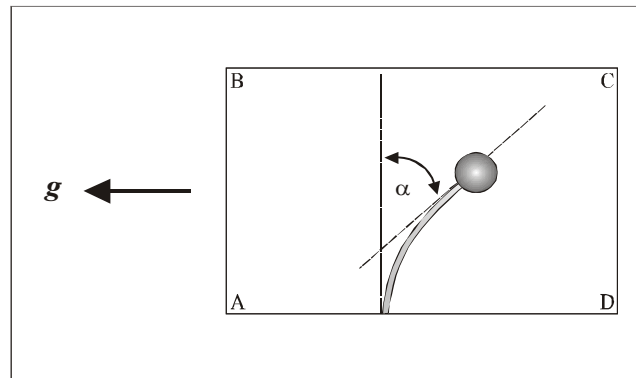
Unmittelbar nach Versuchsende erfolgte die Auswertung. Mittels eines Winkelmessers mit einer 5°-Skalierung konnten die Beugungs- und Abweichwinkel bestimmt werden.

3.24.4.1 Gravitroper Beugungswinkel α

Der gravitrope Beugungswinkel α ergibt sich nach Abb. 32 aus der vertikalen Ausgangsposition und der resultierenden Wachstumsrichtung einer Sporangioaphore. Er gibt an, um wie viel Grad sich eine Sporangioaphore während des Experimentes in der Ebene ABCD gebeugt hat.

Um den gravitropen Beugungswinkel α in den Versuchen zur tonischen Bestrahlung und den Experimenten zur Calciumabhängigkeit in Relation zu den jeweiligen Kontrollen zu setzen, dient Gleichung 14 als Rechenvorschrift, wobei α_K den Beugungswinkel der Kontrollen symbolisiert.

Da es sich bei der gravitropen Beugung auch um eine Längenwachstumsreaktion handelt, werden die Messwerte für die Beugung bei den Versuchen zur Calciumabhängigkeit für das Längenwachstum korrigiert nach folgenden Vorschriften korrigiert.

**Abb. 32**

Darstellung des gravitropen Beugungswinkels α

Die Beugung der Sporangiotheca von *Phycomyces blakesleeianus* um den Winkel α relativ zur vertikalen Ausgangsposition erfolgt in der Ebene ABCD. Die als gravitroper Stimulus dienende Kraft g wirkt in Pfeilrichtung.

$$\text{Gl. 14: relative Beugung [\%]} = \left(\frac{\text{Beugungswinkel } \alpha}{\text{Beugungswinkel } \alpha_K} \right) \times 100$$

$$\text{Gl. 15: Korrekturfaktor } k = \left(\frac{\text{Mittelwert}_{\text{mit Ca}^{2+}}}{\text{Mittelwert}_{\text{ohne Ca}^{2+}}} \right)$$

$$\text{Gl. 16: korrigierter Beugungswinkel } \alpha' = \left(\frac{\text{Beugungswinkel } \alpha}{\text{Korrekturfaktor } k} \right)$$

3.24.4.2 Längenzunahme Δl

Die vor und nach dem Versuch jeweils durchgeführte Bestimmung der Längenzunahme Δl in mm erfolgt durch Messen der Sporangiothecenlänge von der Agaroberfläche bis zum Ansatz des Sporangiums. In der Ergebnisdarstellung werden die Messwerte als relative Längenzunahme bezogen auf die Ausgangslänge der Sporangiothecen nach Gleichung 17 angegeben.

$$\text{Gl. 17: rel. Längenzunahme [\%]} = (\text{Längendifferenz } \Delta l / \text{Ausgangslänge } l_0) \times 100$$

3.24.4.3 Statistik

Die im Abschnitt ‚Ergebnisse‘ dargestellten Resultate der Experimente zur Physiologie von *Phycomyces blakesleeanus* zeigen jeweils die Mittelwerte mit den Standardfehlern. Die Mittelwerte wurden nach Gleichung 18 gebildet.

Gl. 18: Mittelwert $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$

Der Standardfehler der Mittelwerte wurde nach Gleichung 19 berechnet.

Gl. 19: Standardfehler des Mittelwertes $s = \pm \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$

Da bei der Auswertung der physiologischen Experimente die Messwerte in Bezug zu den jeweiligen Kontrollen gesetzt werden mussten, ergaben sich für die Berechnung der Standardfehler die in den Gleichungen 20 u. 21 dargestellten Rechenvorschriften.

Gl. 20: Standardfehler (bei Subtraktion zweier Mittelwerte) $s_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = \pm \sqrt{s_{\bar{x}_1}^2 + s_{\bar{x}_2}^2}$

Gl. 21: Standardfehler (bei Division zweier Mittelwerte) $s_{\frac{\bar{x}_1}{\bar{x}_2}} = \pm \frac{1}{\bar{x}_2} \sqrt{\bar{x}_1^2 \cdot s_{\bar{x}_2}^2 + \bar{x}_2^2 \cdot s_{\bar{x}_1}^2}$

4 Ergebnisse

4.1 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

4.1.1 Absorption isolierter Kristalle

Im Zweistrahlphotometer wurde die Absorption isolierter oktaedrischer Kristalle der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus* gemessen. Zur Verhinderung der Sedimentation waren die Kristalle in Glyzerin resuspendiert. Um die Streueffekte der Kristalle zu kompensieren, wurde in den Referenzstrahlengang zusätzlich eine Kunststoff-Einmalküvette mit der getrübbten Seite eingefügt.

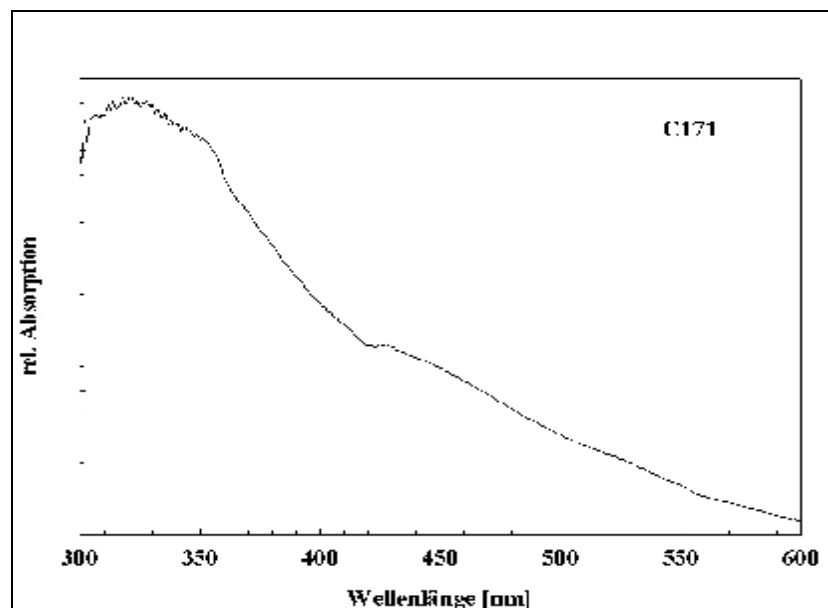


Abb. 33

Absorptionsspektrum isolierter Kristalle der Mutante *C171* aus *Phycomyces blakesleeanus*.

Das Absorptionsspektrum zeigt ein Maximum bei 320 nm und eine Schulter bei 425 nm, sowie einen Ausläufer bis 600 nm. Sowohl die Ähnlichkeit zur Absorption eines einzelnen Kristalls (EIBEL *et al.*, 2000) als auch zum teilweise reduzierten Blaulicht-Photorezeptor CRY1 aus *Arabidopsis thaliana* (LIN *et al.*, 1995a) geben Hinweise auf eine mit den Kristallen assoziierte flavinartige chromophore Gruppe, denen mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden nachgegangen werden soll.

4.1.2 Fluoreszenzanregungsspektren der Kristalle von C171

Die oktaedrischen Kristalle von *Phycomyces blakesleeanus* absorbieren Licht des blauen Spektralbereichs und des nahen UV, zeigen aber weder *in situ* noch nach Isolierung Fluoreszenz, wenn sie mit Blaulicht der Wellenlänge 470 nm angeregt werden. Die Tatsache, dass die Kristalle jedoch nach Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]$ stark fluoreszieren, deutet darauf hin, dass sie mit Komponenten assoziiert sind, die sensitiv gegenüber Reduktions- oder Oxidationsmitteln sind. Bisherige Befunde lassen die Anwesenheit von Flavin vermuten (EIBEL, 1997 und EIBEL *et al.*, 2000). Um die fluoreszierenden Redoxpartner, die mit den oktaedrischen Proteinkristallen assoziiert zu sein scheinen, näher charakterisieren zu können, wurde jeweils die Dichtegradientenfraction mit der größten Kristallkonzentration mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden nach der Isolierung der Kristalle umgehend im Natriumphosphatpuffer durchgeführt. Während der Isolierung wurden die Kristalle zum Schutz vor Oxidation mit dem Reduktionsmittel Dithiothreitol behandelt. Alle Spektren, die direkt ohne zusätzliche Oxidation oder Reduktion der Kristalle entstanden, sind mit ‚DTT‘ gekennzeichnet. Nach der Aufnahme dieser Fluoreszenzspektren wurden die Kristalle mit $K_3[Fe(CN)_6]$ oxidiert und eine zweite Serie von Fluoreszenzspektren erzeugt, bevor die Kristalle dann noch mit Natriumdithionit vollständig reduziert wurden und eine dritte Serie von Fluoreszenzspektren aufgenommen werden konnte.

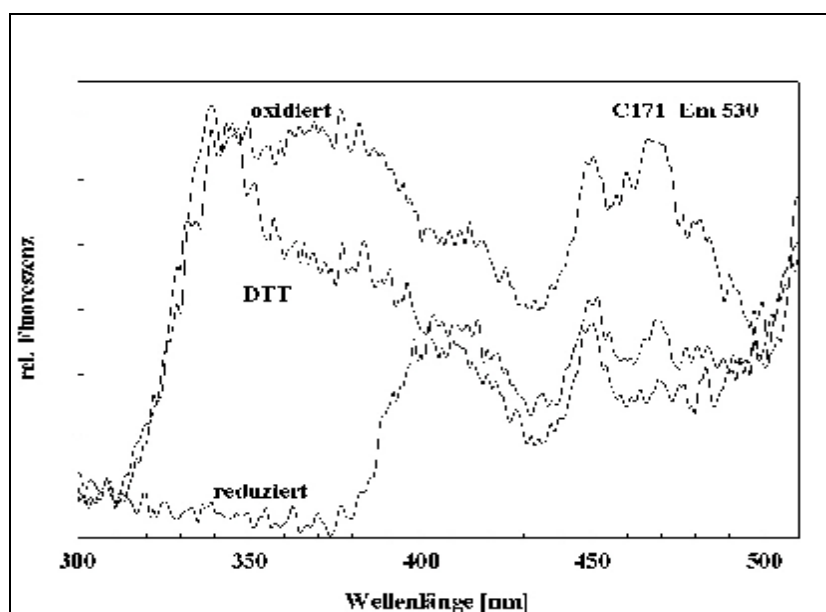


Abb. 34

Unkorrigierte Fluoreszenzanregungsspektren oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171 der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert (DTT) und reduziert. Emission bei 530 nm.

Daher ergaben sich Fluoreszenzspektren von Kristallen in drei verschiedenen Oxidationsstufen: oxidiert, teilreduziert (DTT) und reduziert. Von jeder Oxidationsstufe wurden Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren erzeugt.

Die Anregungsspektren der oktaedrischen Kristalle der Mutante *C171* in ihren drei Oxidationsstufen in Abb. 34 zeigen, dass eine Oxidation insgesamt die Fluoreszenz erhöht, wogegen eine Reduktion zu deren Abnahme führt. Verglichen mit dem Anregungsspektrum des teilreduzierten Gradientenmaterials (DTT) ist die Fluoreszenzzunahme durch Oxidation besonders ausgeprägt oberhalb von 350 nm. Unterhalb davon bewirkt eine Oxidation dagegen keine Fluoreszenzzunahme. Das Anregungsspektrum nach Oxidation zeigt darüber hinaus Maxima bei 340, 450 und 470 nm mit Schultern im Bereich von 370 und 410 nm. Neben einer generellen Abnahme der Fluoreszenz durch Reduktion wird beim Vergleich mit dem Anregungsspektrum der teilreduzierten Kristalle eine starke Fluoreszenzabnahme unterhalb von 400 nm deutlich. Oberhalb davon jedoch zeigen beide Spektren sowohl quantitativ als auch qualitativ einen ähnlichen Verlauf mit Maxima bei 410 und 450 nm und einem zusätzlichen Maximum der teilreduzierten Kristalle bei 470 nm. Während also eine Oxidation eine Fluoreszenzzunahme fast über den gesamten Wellenlängenbereich induziert, resultiert aus einer Reduktion eine Löschung der Fluoreszenz nur in einem Teilbereich. Dieses unterschiedliche Verhalten ist ein Hinweis darauf, dass mit den oktaedrischen Kristallen nicht nur eine, sondern mindestens zwei chromophore Gruppen assoziiert zu sein scheinen.

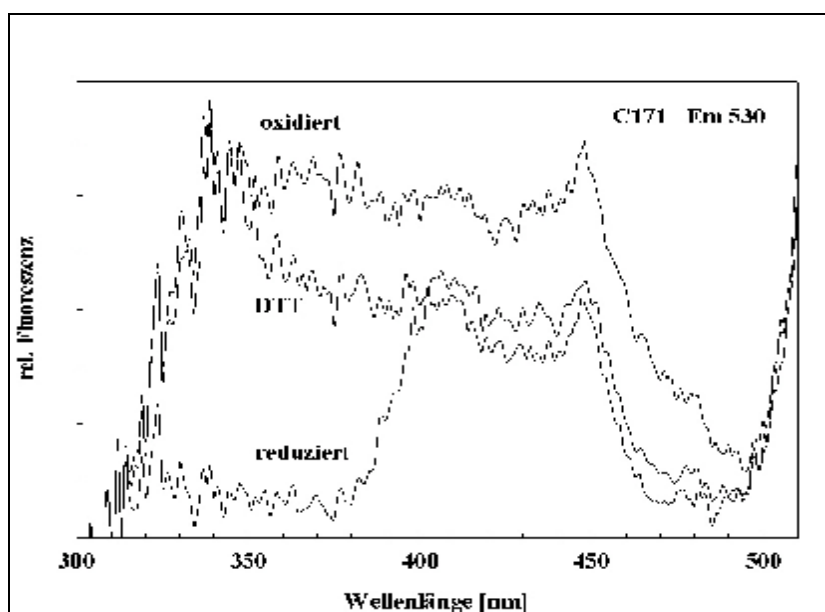


Abb. 35

Korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante *C171* der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert (DTT) und reduziert. Emission bei 530 nm.

Während es sich bei den in Abb. 34 dargestellten Anregungsspektren um Rohspektren handelt, die noch nicht um die Gerätedispersion korrigiert sind, stellt Abb. 35 die entsprechenden korrigierten Anregungsspektren dar.

Diese zeigen zwar einen weitestgehend ähnlichen Verlauf; die Maxima, Minima und Schultern sind jedoch weniger stark ausgeprägt. Das Maximum bei 470 nm in den Spektren der oxidierten und teilreduzierten Probe ist verschwunden. Alle drei Anregungsspektren fallen oberhalb von 450 nm mit einer steilen Flanke ab. Nach Korrektur der Anregungsspektren hat sich der Hinweis erhärtet, dass das ungleichmäßige Verhalten nach Oxidation bzw. Reduktion nicht auf das Vorhandensein nur einer chromophoren Gruppen zurückzuführen ist. Näheren Aufschluss über das Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit vom Redoxzustand können Differenzspektren geben. Die Fluoreszenzexcitationsdifferenzspektren „ox-red“ der Abb. 36 u. 37 sind aus den Ausgangsspektren der Abb. 34 entstanden. Sie repräsentieren die Gesamtdifferenz zwischen vollständig reduzierten und voll oxidierten oktaedrischen Kristallen. Dies bedeutet, dass die Spektren die Fluoreszenz aller Chromophoren in ihrer oxidierten Form wiedergeben.

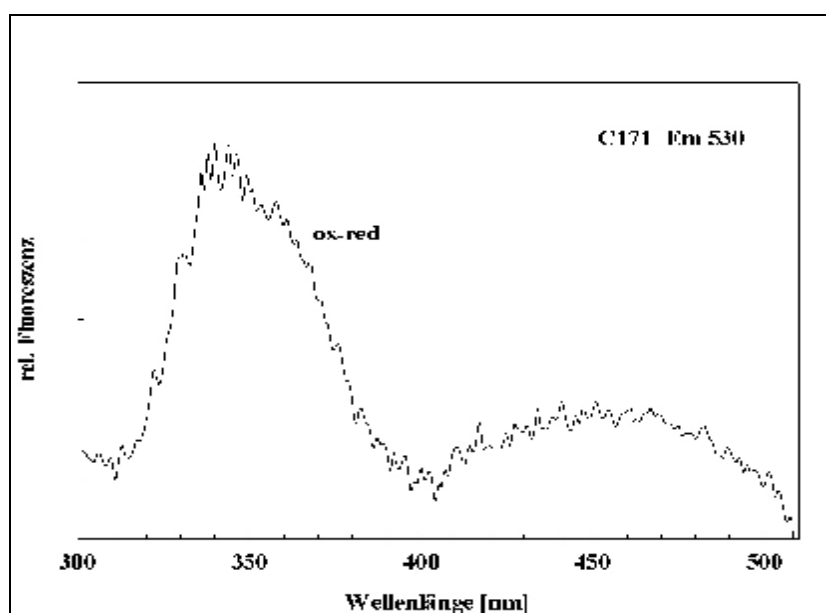


Abb. 36

Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-red“ oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171. Emission bei 530 nm.

Das Anregungsspektrum der Abb. 36 zeigt ein starkes Maximum bei 350 nm und ein schwächeres bei 450-470 nm. Der große Unterschied der Fluoreszenzwerte der Maxima zeigt im Vergleich mit dem Anregungsspektrum von Riboflavin (Abb. 68) deutlich, dass trotz übereinstimmender Lage der Maxima offenbar die flavinartige Fluoreszenz von der einer weiteren Chromophore überlagert wird. Das Anregungsspektrum mit Emission bei 440 nm in

Abb. 37 entspricht mit seinem starken Maximum bei 350 nm dem Spektrum der Referenzsubstanz L-Monapterin (Abb. 74). Daher scheint es möglich, dass das Anregungsspektrum der Abb. 36 ein Gemisch aus pterin- und flavinartigen Chromophoren im oxidierten Zustand repräsentiert.

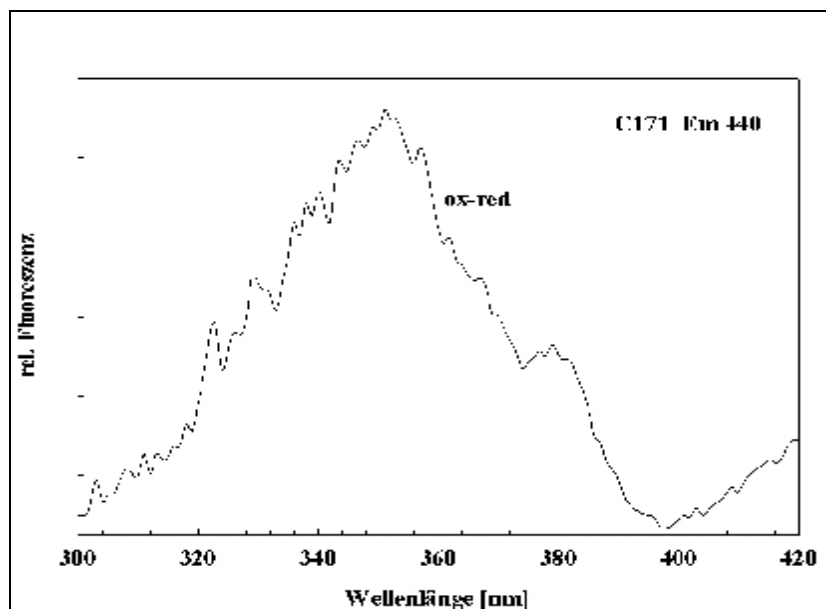
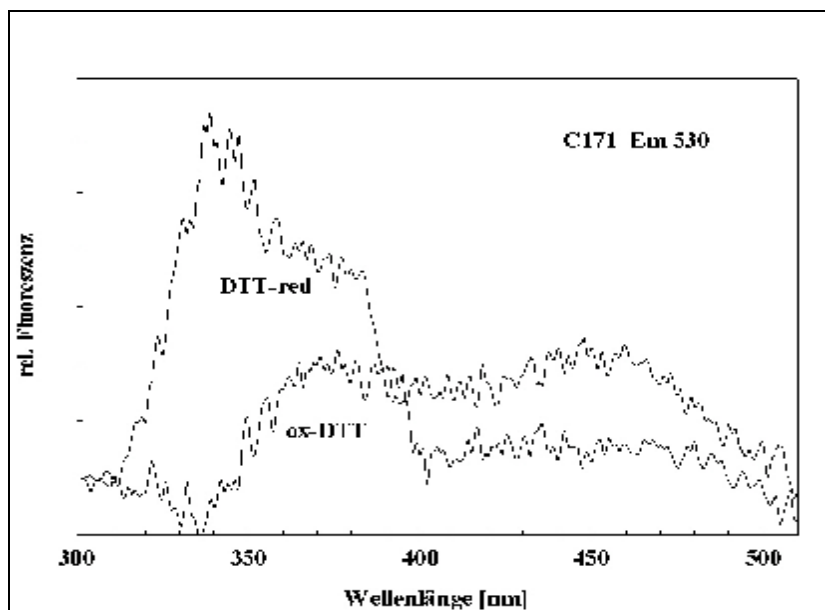


Abb. 37

Korrigiertes Fluoreszenzanregungs-differenzspektrum „ox-red“ oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171. Emission bei 440 nm.

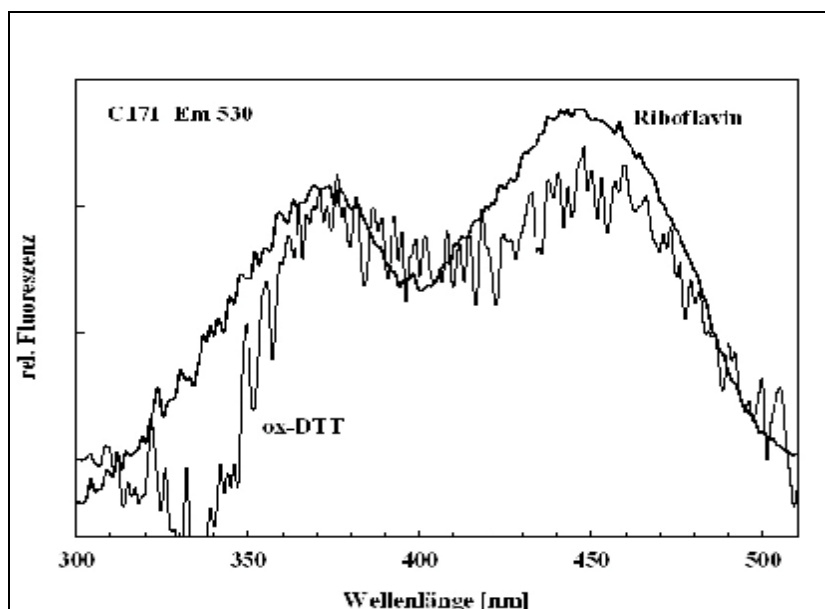
Während die Anregungsspektren der Abb. 36 u. 37 die Fluoreszenz aller mit den Kristallen assoziierten Chromophoren in ihrem voll oxidierten Zustand wiedergeben und somit ein Gemisch repräsentieren, soll mit Hilfe der folgenden Anregungsdifferenzspektren, die die Dreistufigkeit der Redoxzustände der oktaedrischen Kristalle berücksichtigen, die Natur der chromophoren Gruppen näher analysiert werden.

Das Differenzspektrum zwischen teilweise und voll reduzierten Kristallen („DTT-red“) zeigt eine starke Fluoreszenz unterhalb von 400 nm mit einem Maximum bei 340 nm und einer Schulter bei 380 nm. Der Verlauf oberhalb von 400 nm ist dagegen bis 480 nm gleichbleibend. Das Differenzspektrum aus oxidiertem und teilreduziertem Material („ox-DTT“) dagegen verläuft weniger zweigeteilt. Die Fluoreszenz steigt ab 340 nm steil an bis zu einem Maximum bei 380 nm. Ein weiteres Fluoreszenzmaximum kristallisiert sich bei 450 nm heraus. Noch deutlicher als in den Ausgangsspektren der Abb. 34 u. 35 erkennt man anhand der Differenzspektren, dass die Fluoreszenzänderungen nicht gleichförmig sind, sondern eigene, höchst unterschiedliche, charakteristische Verläufe der Spektren entstehen und daher mit den oktaedrischen Kristallen mindestens zwei chromophore Gruppen assoziiert sind.

**Abb. 38**

Korrigierte Fluoreszenzanregungs-differenzspektren teilreduzierter oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171. Emission bei 530 nm.

Der Vergleich des Differenzspektrums „ox-DTT“ mit dem Absorptionsspektrum von Riboflavin in Abb. 39 zeigt eine deutliche Übereinstimmung des zweigipfeligen Verlaufs und deutet auf ein flavinartiges Pigment als eine chromophore Gruppe der oktaedrischen Kristalle von *Phycomyces blakesleeanus* hin.

**Abb. 39**

Korrigiertes Fluoreszenzanregungs-differenzspektrum teilreduzierter oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171 nach Oxidation im Vergleich mit dem Absorptionsspektrum von Riboflavin. Emission bei 530 nm.

Die große Ähnlichkeit des zweiten Differenzspektrums („DTT-red“) mit dem Absorptionsspektrum von L-Monapterin in der folgenden Abbildung lässt den Schluss zu, dass ein pterinartiges Pigment als weiterer Redoxpartner der Kristalle in Frage kommt.

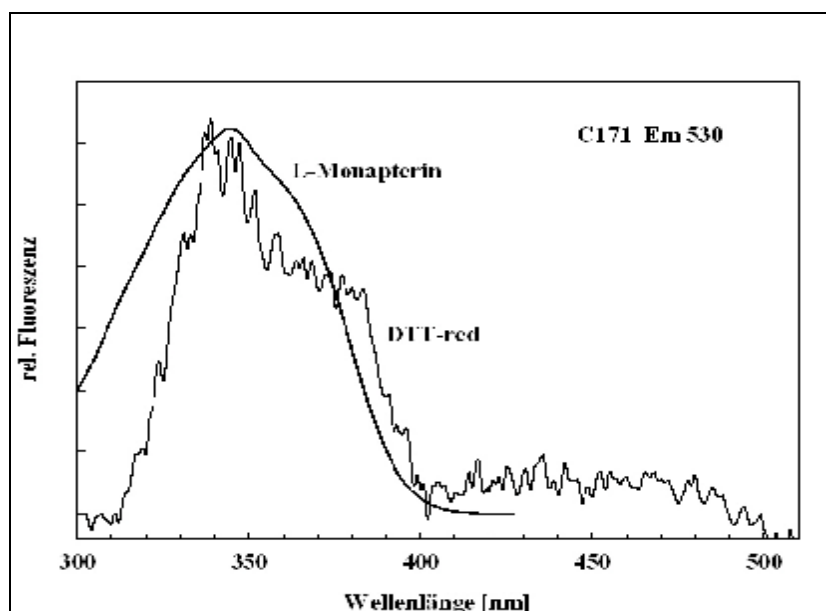


Abb. 40

Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum teilreduzierter oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171 nach Reduktion im Vergleich mit dem Absorptionsspektrum von L-Monapterin. Emission bei 530 nm.

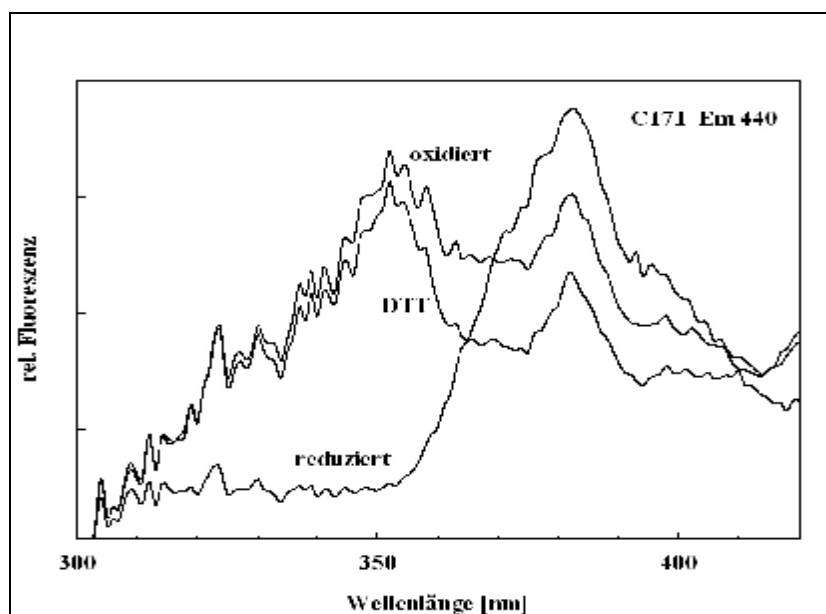


Abb. 41

Korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171 der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert (DTT) und reduziert. Emission bei 440 nm.

Bei den Spektren der Abb. 41 wurde im Hinblick auf das Vorhandensein von pterinartigen Pigmenten, die typischerweise mit einem Maximum bei 440 nm Fluoreszenz emittieren, die Fluoreszenzanregung gegen diese Wellenlänge gemessen. Deutlich zeigt sich das Maximum bei 350 nm im teilreduzierten und oxidierten Zustand der Kristalle und entspricht somit auch den Spektren in Abb. 35. Eine Oxidation bewirkt nahezu keine Fluoreszenzsteigerung. Anders jedoch bei dem Maximum bei 380 nm. Es kommt zur Fluoreszenzzunahme nach Oxidation und Fluoreszenzlöschung nach Reduktion. Die paradoxe Zunahme der Fluoreszenz bei 380 nm sowohl nach Oxidation als auch Reduktion ist artifiziell, wie Abb. 78 zeigt. Das Anregungsdifferenzspektrum „ox-DTT“ der Abb. 42 zeigt die Fluoreszenzsteigerung bei 380 nm nach Oxidation ebenfalls deutlich. Auch hier erscheint die Schulter bei 400 nm.

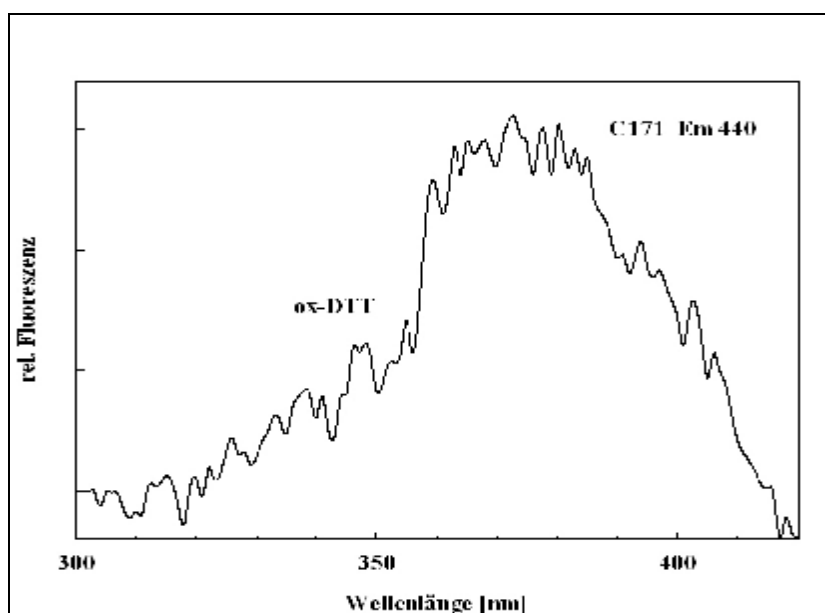


Abb. 42

Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum nach Oxidation teilreduzierter oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeana*-Mutante C171. Emission bei 440 nm.

Obwohl das Differenzspektrum auf pterinartige Chromophoren hinweist, kann die Verbreiterung des Maximums bei 380 nm und die Schulter bei 400 nm zunächst nicht geklärt werden.

4.1.3 Fluoreszenzemissionsspektren der Kristalle von C171

Neben den Fluoreszenzanregungsspektren zeigen auch die Emissionsspektren charakteristische Verläufe in Abhängigkeit vom Redoxzustand. Zunächst wurde mit Licht der Wellenlänge von 470 nm angeregt und die Emission in einem Bereich von 490 bis 600 nm gemessen. Eine

Anregung bei 470 nm ist besser geeignet, da im Gegensatz zum Maximum im kürzerwelligen Bereich einer flavinartigen Fluoreszenz keine Überlagerung durch Fluoreszenz einer weiteren Komponente aufzutreten scheint. Auch die Emissionsspektren in Abb. 43 spiegeln die Dreistufigkeit der Redoxzustände der oktaedrischen Kristalle wider. Durch Oxidation wird auch die Fluoreszenzemission stark erhöht und ein Maximum bei 530 nm ausgebildet. Dagegen wird wiederum durch Reduktion die Fluoreszenz drastisch verringert. Alle drei Spektren zeigen ein weiteres Maximum bei 560 nm.

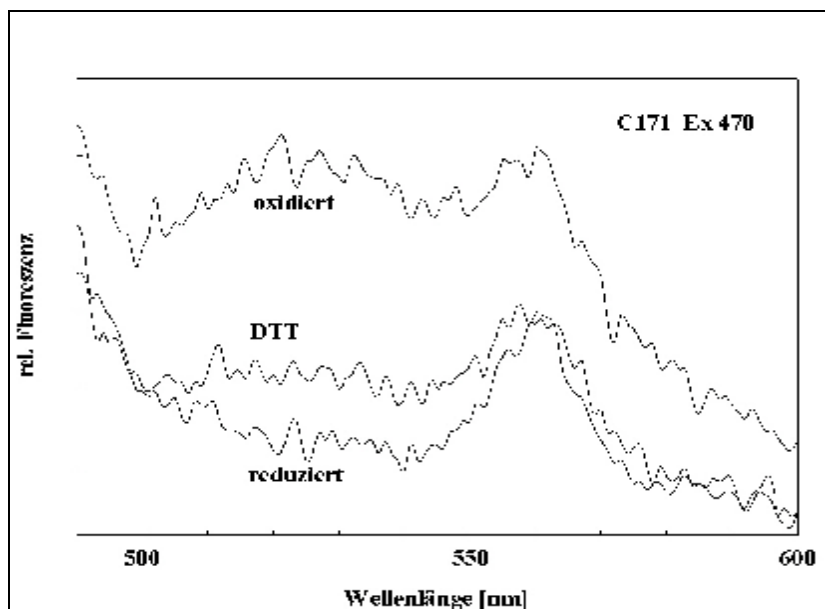
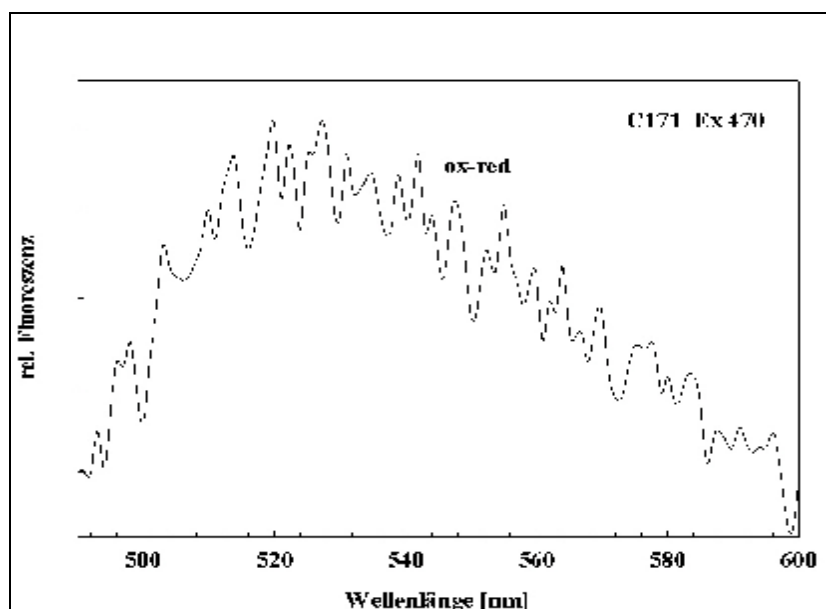


Abb. 43

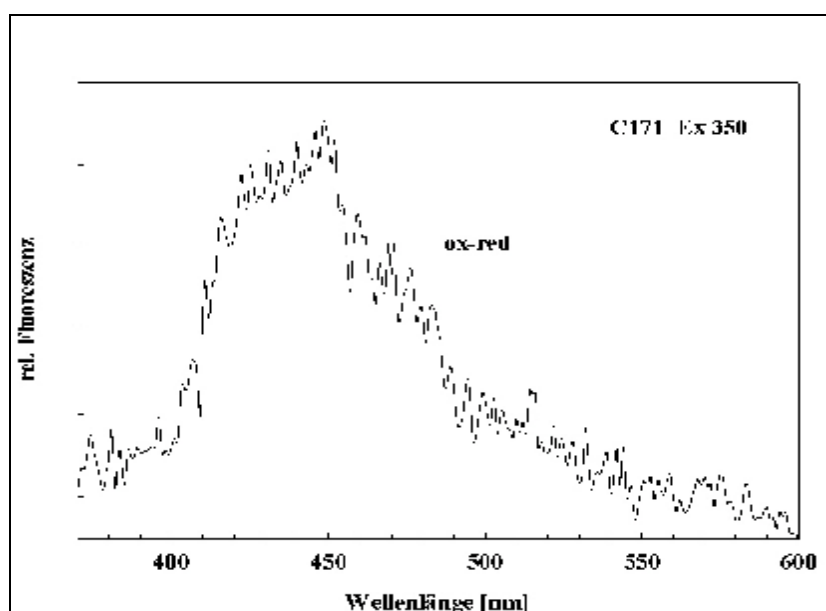
Fluoreszenzemissionsspektren oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante *C171* der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert (DTT) und reduziert. Anregung bei 470 nm.

Analog zu den Anregungsspektren sollen zunächst die Fluoreszenzemissionsdifferenzspektren „ox-red“, welche die Gesamtfluoreszenz der chromophoren Gruppen in ihrer oxidierten Form wiedergeben, betrachtet werden.

Die Emissionsdifferenzspektren zeigen je nach Anregungswellenlänge, dass es sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um ein Gemisch aus pterin- und flavinartigen Chromophoren handelt und bestätigen damit die Hinweise aus den Fluoreszenzanregungsdifferenzspektren der Abb. 36 u. 37. Wird mit Licht der Wellenlänge 470 nm angeregt, so ergibt sich die für Flavine charakteristische Emission mit dem Maximum bei 530 nm (Abb. 44). Eine Anregung im kürzerwelligen Bereich bei 350 nm führt dagegen zur pterintypischen Emission mit dem Maximum bei 440 nm (Abb. 45).

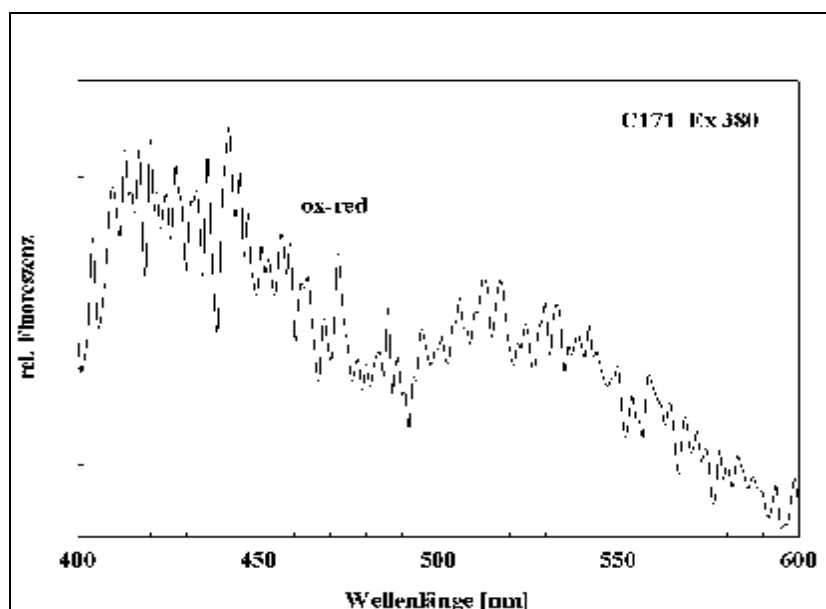
**Abb. 44**

Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum „ox-red“ oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171. Anregung bei 470 nm.

**Abb. 45**

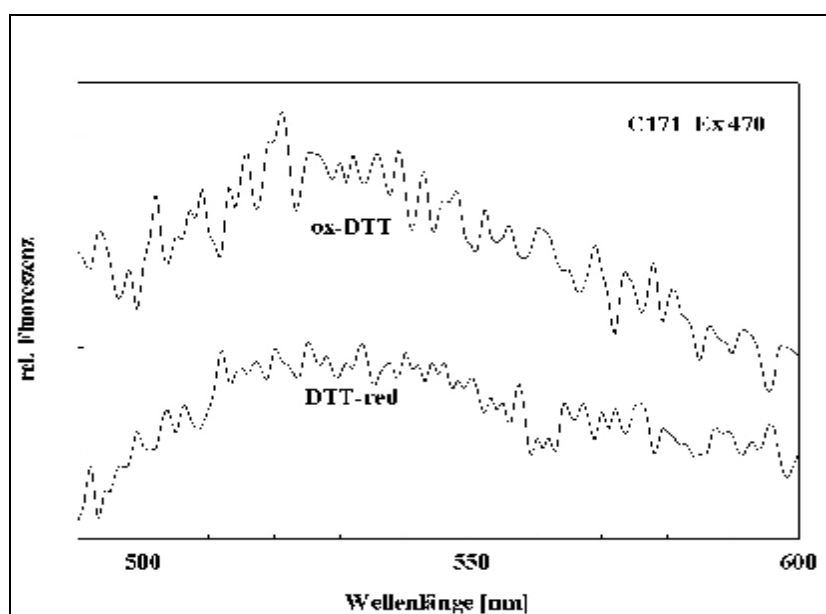
Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum „ox-red“ oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171. Anregung bei 350 nm.

Durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 380 nm lässt sich ein Emissionsspektrum erzeugen, das sowohl pterin- als auch flavinartige Chromophoren repräsentiert. Wiederum ist das Emissionsmaximum für pterinartige Pigmente bei 440 nm zu erkennen, wie auch die typische Fluoreszenzemission für Flavine bei 530 nm (Abb. 46).

**Abb. 46**

Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum „ox-red“ oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171. Anregung bei 380 nm.

Um nähere Aussagen über die Natur der chromophoren Gruppen treffen zu können, wurden auch aus den Emissionsspektren Differenzspektren generiert, die in der folgenden Abb. 47 wiedergegeben sind.

**Abb. 47**

Fluoreszenzemissionsdifferenzspektren oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171. Anregung bei 470 nm.

Beide Differenzspektren zeigen ein Maximum bei 530 nm, das allerdings im Falle der oxidierten Kristalle „ox-DTT“ wesentlich ausgeprägter in Erscheinung tritt als nach Reduktion („DTT-red“). Das Vorhandensein dieses Maximums im Differenzspektrum „DTT-red“ bestätigt, dass die Kristalle im teilreduzierten Zustand eben auch noch teilweise oxidiert sind. Nicht mehr vorhanden ist das Maximum bei 560 nm. Dies weist auf ein Artefakt hin, das beispielsweise durch Puffer hervorgerufen worden sein könnte (siehe Abb. 77). Der übereinstimmende Verlauf des Differenzspektrums „ox-DTT“ mit dem Emissionsspektrum von Riboflavin in Abb. 48 bestätigt trotz des verrauschten Kristallspektrums die bisher erhaltenen Hinweise auf ein flavinartiges Pigment als chromophore Gruppe der oktaedrischen Kristalle aus *Phycomyces blakesleeanus*.

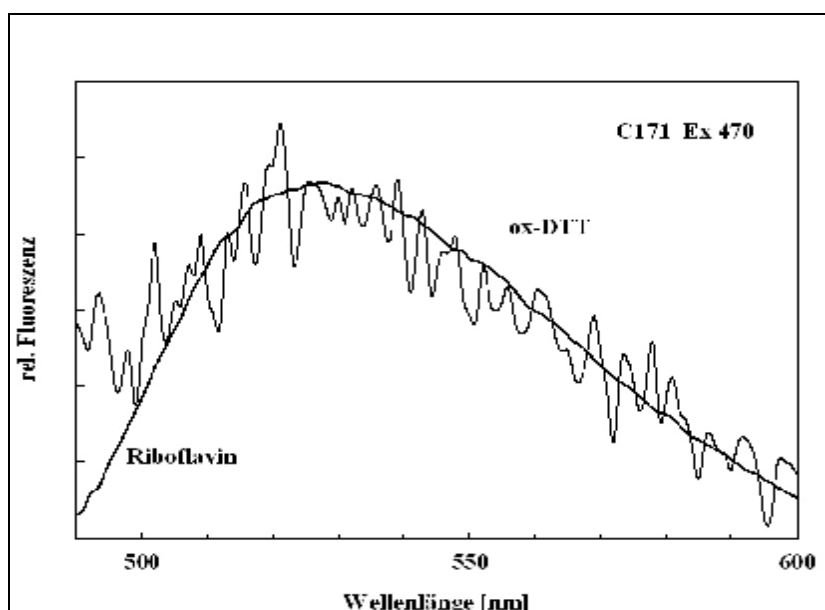
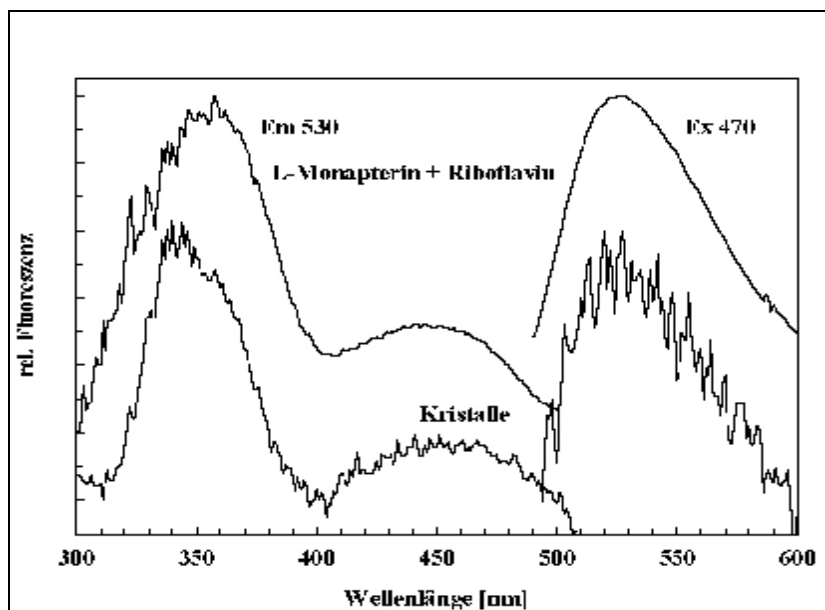


Abb. 48

Fluoreszenzemissionsspektren teilreduzierter oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante *C171* nach Oxidation im Vergleich mit dem Emissionsspektrum von Riboflavin. Anregung bei 470 nm.

Der zusammenfassende Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren der isolierten oxidierten oktaedrischen Kristalle der Mutante *C171* mit den korrespondierenden Fluoreszenzspektren eines wässrigen Gemisches aus $9,5 \times 10^{-7} \text{ M}$ L-Monapterin und $4,9 \times 10^{-8} \text{ M}$ Riboflavin in Abb. 49 bestätigt einerseits den Gemischcharakter der Chromophoren, auf den schon die Differenzspektren „ox-red“ hindeuteten.

Andererseits liefert dieser Vergleich durch die nahezu perfekte Übereinstimmung der Anregungs- und Emissionsspektren sehr gute Hinweise auf flavin- und pterinartige Pigmente als mit den Kristallen assoziierte chromophore Gruppen.

**Abb. 49**

Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante *C171* mit einem wässrigen Gemisch aus $9,5 \times 10^{-7}$ M L-Monapterin und $4,9 \times 10^{-8}$ M Riboflavin. Emission bei 530 nm, Anregung bei 470 nm.

4.1.4 Fluoreszenzanregungsspektren der Kristalle vom *WT*

Wie bei den oktaedrischen Kristallen der Mutante *C171* wurden auch die teilreduzierten Kristalle des Wildtyps von *Phycomyces blakesleeanus* erst oxidiert und dann nachfolgend vollständig reduziert (Abb. 50). Insgesamt steigt die Fluoreszenz durch Oxidation, wogegen sie durch Reduktion abnimmt. Der Verlauf des noch unkorrigierten Anregungsspektrums der oxidierten Kristalle zeigt ein Maximum bei 340-350 nm mit einer breiten Schulter bis etwa 420 nm. Der weitere Verlauf entspricht den reduzierten Kristallen. Im Bereich von 450-500 nm tritt gegenüber den Anregungsspektren der reduzierten und teilreduzierten Kristalle eine Fluoreszenzsteigerung mit einem Maximum bei 470 nm auf. Die Reduktion bewirkt eine Fluoreszenzlöschung bis 360 nm. Ab etwa 375 nm steigt die Fluoreszenz über das Maß der teilreduzierten Kristalle. Ab etwa 450 nm verlaufen die Anregungsspektren von vollständig reduzierten und teilreduzierten Kristallen nahezu gleich.

Aus dem Vergleich der Anregungsspektren des Wildtyps mit denen der Mutante *C171* (Abb. 34) gehen recht große Unterschiede hervor. Besonders augenfällig ist dies bei den Anregungsspektren der oxidierten Kristalle. Die Spektren der reduzierten Kristalle zeigen dagegen die größten Ähnlichkeiten. Die Unterschiede könnten darauf beruhen, dass im Falle des Wildtyps einerseits weniger flavinartige Pigmente an die Kristalle gebunden waren, andererseits

die beim Wildtyp nach Reduktion beobachtete Zunahme der Fluoreszenz im Bereich von 375-450 nm auf einen weiteren Redoxpartner hindeutet.

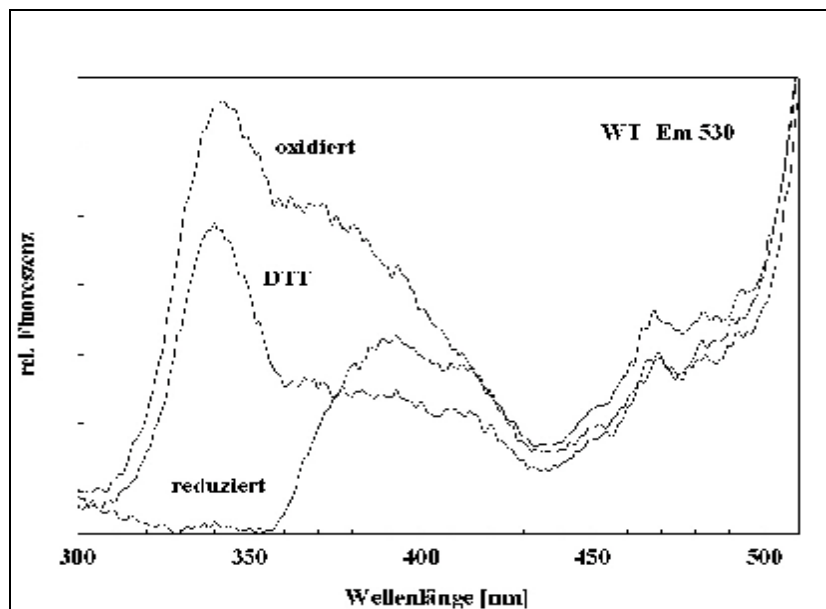


Abb. 50

Unkorrigierte Fluoreszenzanregungsspektren oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeana*-Wildtyps NRRL1555 der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert (DTT) und reduziert. Emission bei 530 nm.

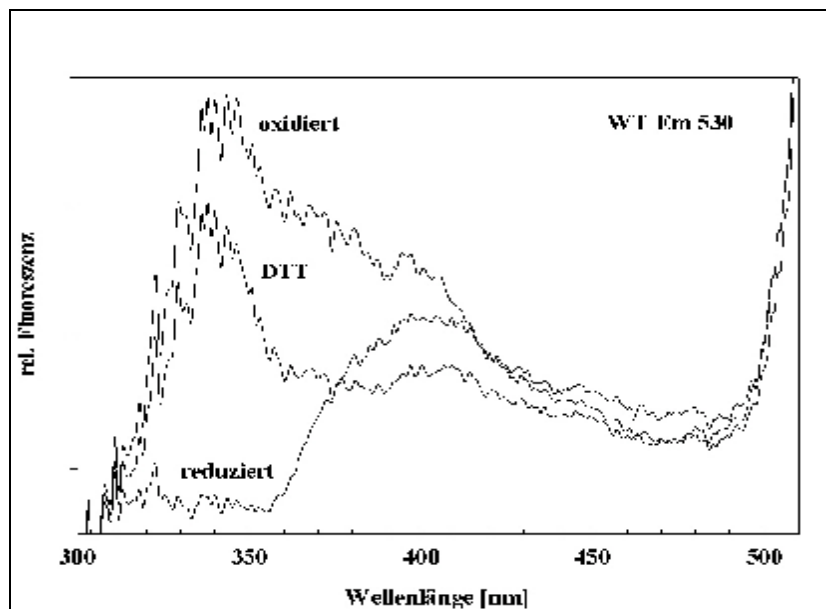


Abb. 51

Korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeana*-Wildtyps NRRL1555 der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert (DTT) und reduziert. Emission bei 530 nm.

Die korrigierten Fluoreszenzanregungsspektren der Abb. 51 bleiben im Vergleich zu den unkorrigierten Anregungsspektren weitestgehend gleich. Die oxidierten Kristalle zeigen die größte Fluoreszenz, jedoch nicht so ausgeprägt im längerwelligen Bereich wie bei der Mutante

C171 (Abb. 34 u. 35). Das deutliche Maximum bei etwa 340 nm und die breite Schulter bis 420 nm bleiben nach Korrektur erhalten. Zwischen 440 und 490 nm bleibt die Fluoreszenz ebenfalls am größten; allerdings verschwindet auch hier das Maximum bei 470 nm nach Korrektur. Die reduzierten Kristalle fluoreszieren bis etwa 360 nm nicht. Oberhalb steigt die Fluoreszenz bis zu einem Maximum bei 400 nm an. Die Fluoreszenz im Bereich von 375-460 nm bleibt größer als bei dem teilreduzierten Gradientenmaterial, was auf das Vorhandensein mindestens zweier unterschiedlich fluoreszierender Redoxpartner hindeutet.

Die Betrachtung der Differenzspektren kann näheren Aufschluss über die Zusammensetzung der Redoxpartner geben. Analog der Fluoreszenzanregungsdifferenzspektren der Kristalle der Mutante *C171* sind in den folgenden Abb. 52 u. 53 die Fluoreszenzdifferenzspektren „ox-red“ dargestellt, welche die Fluoreszenz aller Chromophoren in ihrem oxidierten Zustand zeigen.

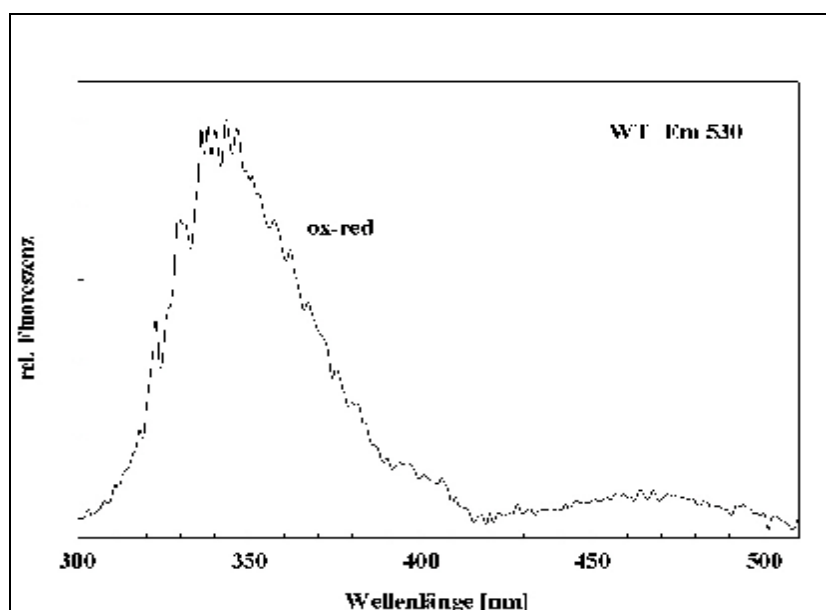
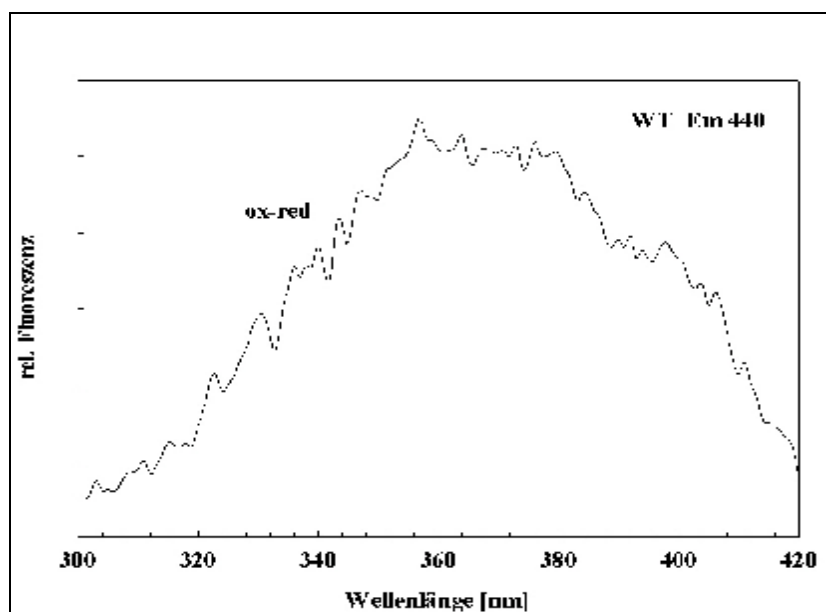


Abb. 52

Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-red“ oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps NRRL1555. Emission bei 530 nm.

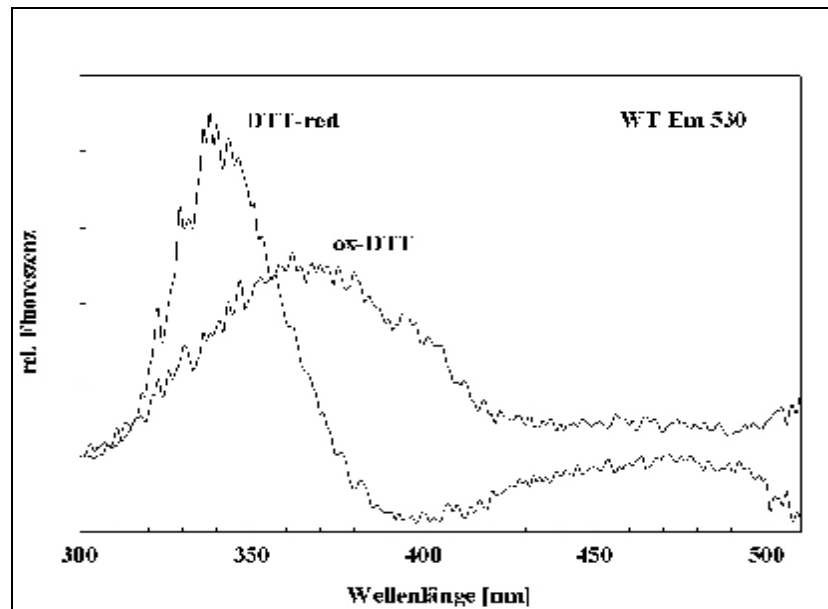
Fixiert man die Emission bei 530 nm, wie es für Flavine charakteristisch ist, so ergibt sich ein Anregungsspektrum mit einem großen Maximum bei 350 nm und einem schwachen Maximum im Bereich von 450-470 nm (Abb. 52). Dieser Verlauf deutet, wie auch schon bei den Kristallen der Mutante *C171*, auf ein Gemisch aus pterin- und flavinartigen Pigmenten hin. Wird dagegen ein Anregungsspektrum mit einer für Pterine kennzeichnenden Emissionswellenlänge von 440 nm gemessen, ergibt sich eine starke Fluoreszenz bei 350 nm (Abb. 53). Dies stützt die Vermutung, dass die flavinartige Fluoreszenz bei dieser Wellenlänge in Abb. 52 von einer pterinartigen Komponente verstärkt wird.

**Abb. 53**

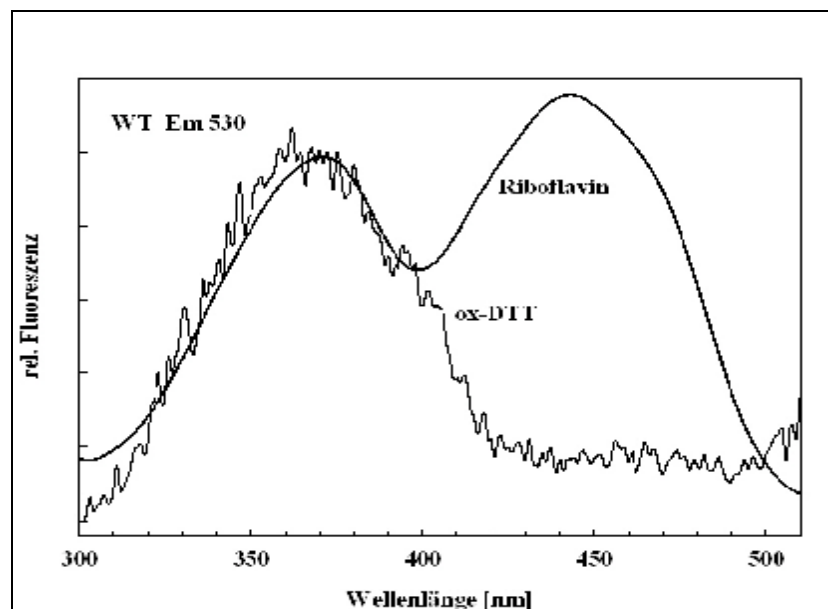
Korrigiertes Fluoreszenzanregungs-differenzspektrum „ox-red“ oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps NRRL1555. Emission bei 530 nm.

In Abb. 54 sind Anregungsdifferenzspektren gezeigt, die die Teilstufen der Redoxzustände der mit den oktaedrischen Kristallen assoziierten chromophoren Gruppen darstellen. Das Differenzspektrum „ox-DTT“ besitzt ein deutliches Maximum bei 370 nm und ein kleines, schwach ausgeprägtes Maximum bei 470 nm. Werden die Kristalle reduziert und das Differenzspektrum „DTT-red“ gebildet, so wird ein Maximum bei 340 nm und ein weiteres im längerwelligen Bereich bei 470 nm deutlich.

Die Differenzspektren der Abb. 54 offenbaren, dass neben einer flavinartigen Chromophore mindestens eine weitere mit den Kristallen des Wildtyps assoziiert ist. Zu berücksichtigen ist, dass das Differenzspektrum „DTT-red“ einen größeren Anteil reduzierter Chromophore oder Redoxpartner widerspiegelt. Bemerkenswert beim Vergleich der beiden Differenzspektren ist, dass es bei Oxidation zu einer bathochromen Verschiebung des Maximums von zuvor 340/350 nm nach etwa 370/380 nm kommt. Zusätzlich erscheint eine Schulter bei 400 nm. Das stark ausgeprägte Maximum bei 340/350 nm könnte beispielsweise auch auf NADH zurückzuführen sein, das nur im reduzierten Zustand fluoresziert (vgl. Abb. 76). Im Falle des Differenzspektrums „DTT-red“ liegt ein weitgehend reduzierter Zustand der Kristalle vor, wodurch eine NADH-Fluoreszenz begünstigt wird. In stärker oxidiertem Umgebung verschiebt sich die Fluoreszenz zu Gunsten flavin- und pterinartiger Chromophoren, wobei bei letzteren das Fluoreszenzmaximum bathochrom verschoben zu sein scheint.

**Abb. 54**

Korrigierte Fluoreszenzanregungsdifferenzspektren oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleanus*-Wildtyps NRRL1555. Emission bei 530 nm.

**Abb. 55**

Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum (Emission bei 530 nm) teilreduzierter oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleanus*-Wildtyps NRRL1555 nach Oxidation im Vergleich mit dem Absorptionsspektrum von Riboflavin.

Der Vergleich des Differenzspektrums „ox-DTT“ mit dem Absorptionsspektrum von Riboflavin in Abb. 55 macht deutlich, dass das starke Maximum bei 350-370 nm nicht alleine durch eine flavinartige Komponente hervorgerufen wird. Es liegt nahe, dass eine weitere chromophore Gruppe für diese starke Fluoreszenz verantwortlich ist und die relativ schwache flavinartige Fluoreszenz in dem kürzerwelligen Bereich überlagert. Der Vergleich mit den

Anregungsspektren der Kontrollen in Abb. 74 macht deutlich, dass für das starke Maximum bei 350-370 nm nach Oxidation auch ein pterinartiges Pigment in Frage kommen kann. Dagegen scheint das Differenzspektrum „DTT-red“, das ja die Differenz aus teilreduzierten und voll reduzierten Kristallen und damit netto Fluoreszenz nach Oxidation darstellt, mit dem stärker ausgeprägten Maximum bei 450-470 nm mehr Flavincharakter zu besitzen, im kürzerwelligen Bereich aber dennoch von pterinartigen Fluoreszenz überlagert wird.

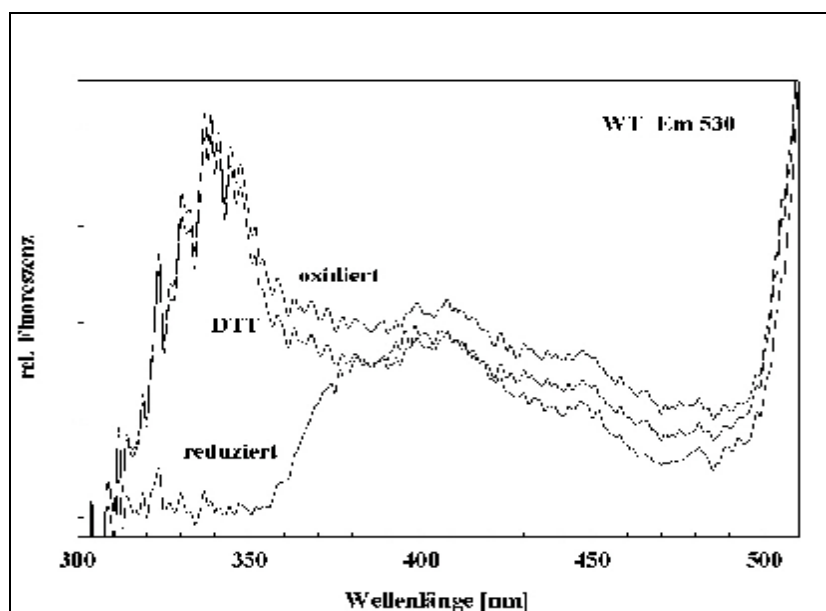


Abb. 56

Korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps *NRRL1555* der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert (DTT) und reduziert. Emission bei 530 nm.

Die vorstehende Abbildung mit korrigierten Anregungsspektren einer weiteren Aufarbeitung von oktaedrischen Kristallen des Wildtyps stützt die These, dass offenbar die Redoxbedingungen der verschiedenen Kristallisierungen variieren und daraus eine Verschiebung der aktuell gemessenen Chromophorenzusammensetzung resultiert. In dieser Abbildung wie auch in der folgenden Darstellung des Differenzspektrums „ox-DTT“ in Abb. 57 wird eine stärkere Fluoreszenzzunahme über einen größeren Wellenlängenbereich als in der zuvor besprochenen Aufarbeitung (Abb. 50 u. 51) der Wildtyp-Kristalle deutlich. Dagegen kommt es hier zu keiner Fluoreszenzsteigerung der reduzierten gegenüber der teilreduzierten Kristalle. Ursächlich für diese höhere Fluoreszenz nach Reduktion der Wildtyp-Kristalle im Vergleich mit der Mutante *C171* und der zweiten Aufarbeitung von Kristallen des Wildtyps ist eine stärkere Oxidation während der Aufarbeitung. Die Folge ist ein Verlust der flavinartigen Chromophore, was sich in der weitaus schwächer ausgeprägten Zweigipfeligkeit des Differenzspektrums der Abb. 55 äußert. Die während der Aufarbeitung stattgefundene stärkere Oxidation bedeutet gleichzeitig

eine schwächere Reduktion als bei *C171*. Die Fluoreszenz kann daher bei vollständiger Reduktion noch erhöht werden (Abb. 50 u. 51). Die Kristalle der Mutante *C171* dagegen sind während der Isolierung bereits stärker reduziert. Aus der stärkeren Reduktion resultiert eine größere Oxidierbarkeit und damit in der Folge stärkere Fluoreszenz oxidiert flavinartiger Chromophoren. Dementsprechend lässt sich die Fluoreszenz derjenigen chromophoren Gruppe, die bei den Kristallen des Wildtyps im Bereich von 375-460 nm stärker ausgeprägt ist, durch weitere Reduktion nicht erhöhen (Abb. 34 u. 35).

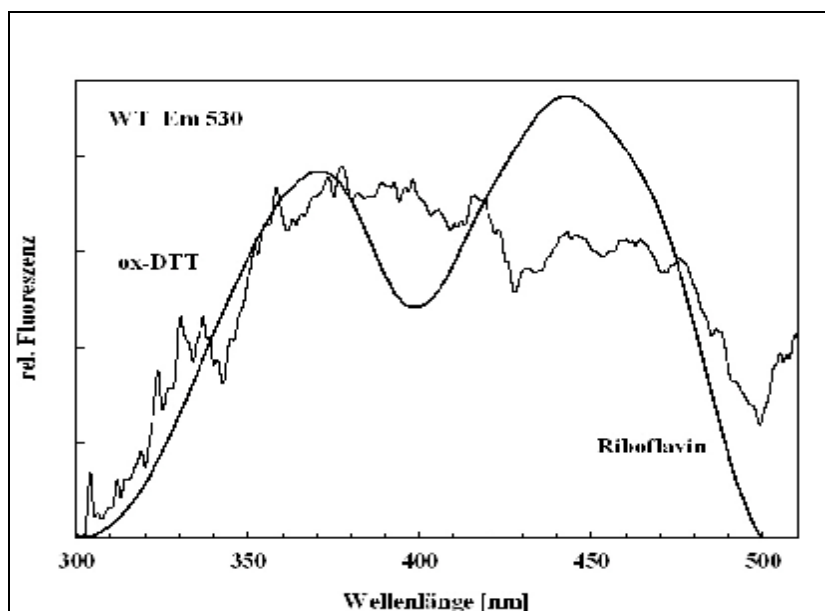
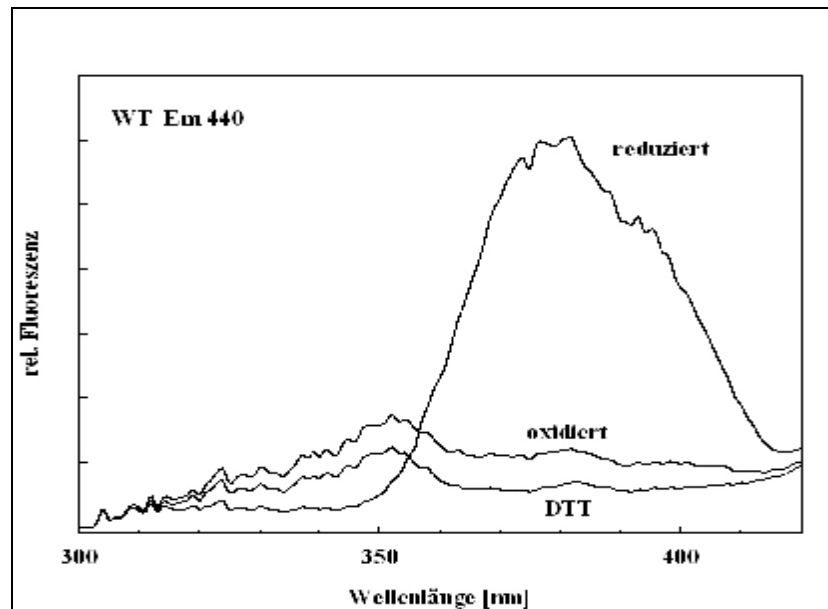


Abb. 57

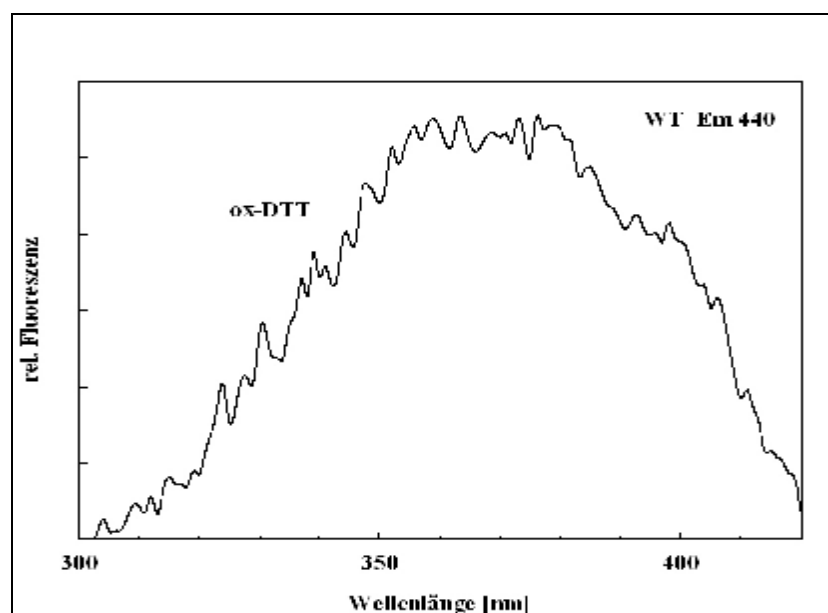
Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum (Emission bei 530 nm) teilreduzierter oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps NRRL1555 nach Oxidation im Vergleich mit dem Absorptionsspektrum von Riboflavin.

Die nähere Untersuchung der Kristalle des Wildtyps auf die Anwesenheit von pterinartigen Pigmenten anhand von Anregungsspektren mit der für diese Chromophoren typischen Emission bei 440 nm zeigt beim Vergleich mit den entsprechenden Spektren der Kristalle der Mutante *C171* (Abb. 41 u. 42) nahezu gleiche Verhältnisse.

Abb. 58 beschreibt neben der Fluoreszenzsteigerung nach Oxidation mit deutlichem Maximum bei 350 nm ebenfalls das schon beobachtete außergewöhnliche Maximum bei 380 nm nach Reduktion. Auch das Differenzspektrum „ox-DTT“ in Abb. 59 spricht sehr für ein pterinartiges Pigment als zweite mit den oktaedrischen Kristallen assoziierte chromophore Gruppe.

**Abb. 58**

Korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps NRRL1555 der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert (DTT) und reduziert. Emission bei 440 nm.

**Abb. 59**

Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum nach Oxidation teilreduzierter oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps NRRL1555. Emission bei 440 nm.

Ob das etwas in den längerwelligen Bereich ausgezogene Maximum mit der Schulter bei 400 nm seine Ursache im Kristall-Chromophoren-Komplex hat oder ein Artefakt darstellt, kann nicht abschließend geklärt werden. Sicher ist jedoch die überproportionale Fluoreszenzsteigerung bei 380 nach Reduktion artifizierlicher Natur (vgl. Abb. 78).

4.1.5 Fluoreszenzemissionsspektren der Kristalle vom *WT*

Analog zu den Fluoreszenzemissionsmessungen bei den Kristallen der Mutante *C171* wurden zur näheren Charakterisierung von den Kristallen des Wildtyps Fluoreszenzemissionsspektren der drei Redoxzustände mit der Anregung bei 470 nm erzeugt. Die folgende Abbildung gibt die drei Emissionsspektren im Bereich von 490-600 nm wieder.

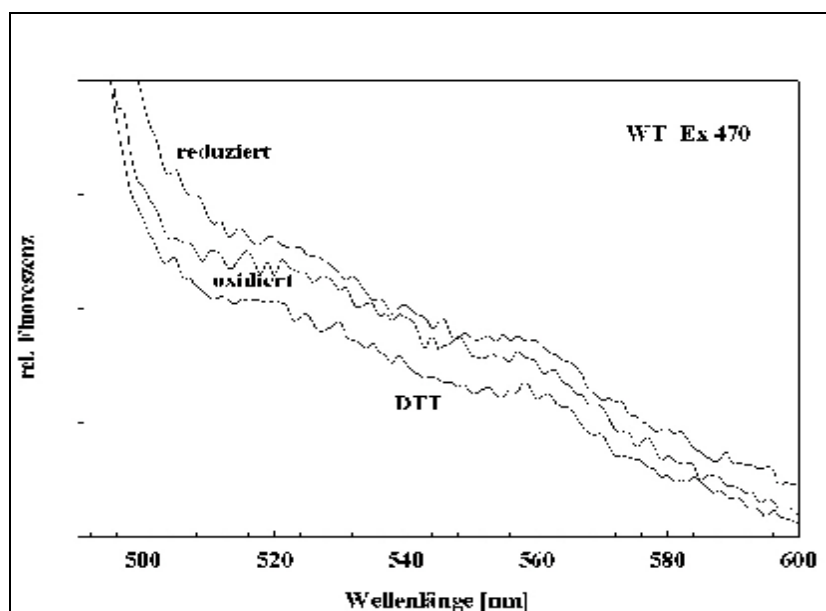
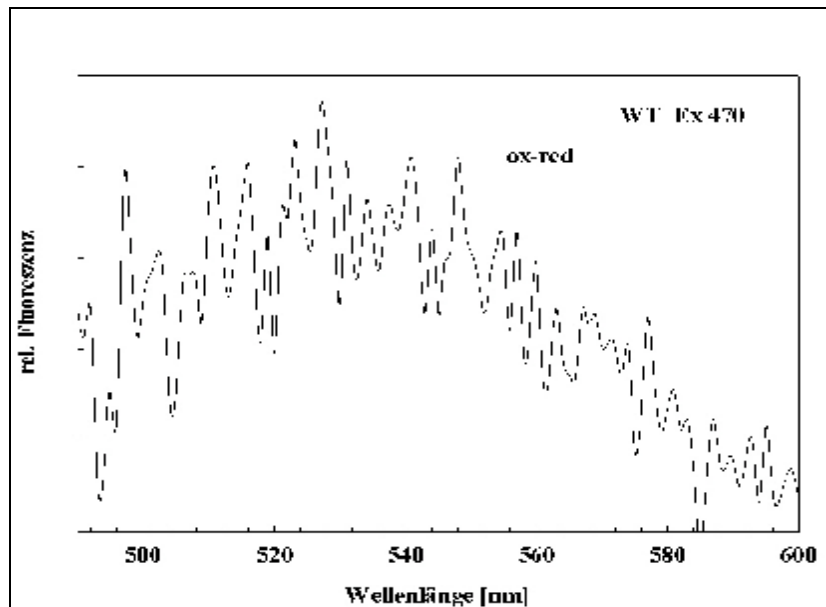


Abb. 60

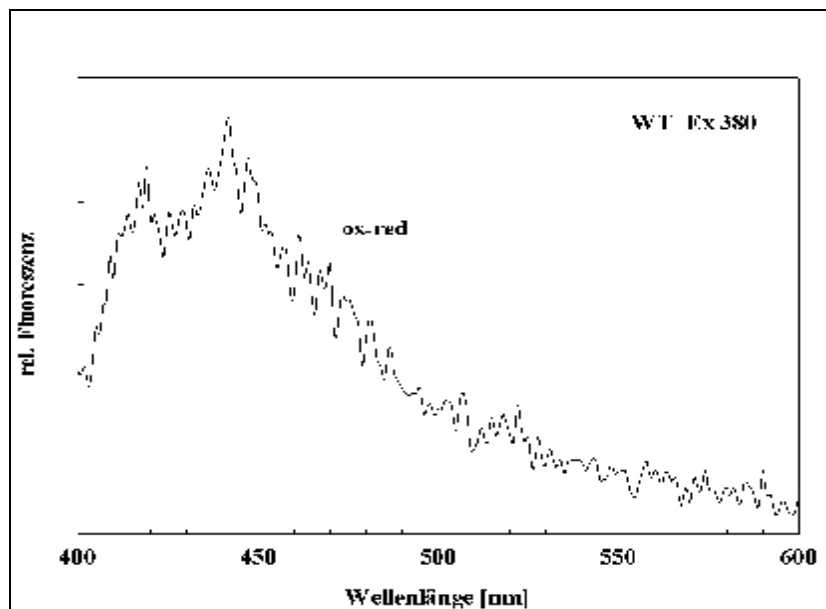
Fluoreszenzemissionsspektren oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps *NRRL1555* der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert (DTT) und reduziert. Anregung bei 470 nm.

Alle drei Emissionsspektren zeigen einen recht ähnlichen Verlauf mit einem leichten Maximum bei 525/530 nm und einer Schulter bei 560 nm. Bemerkenswert ist die scheinbare Fluoreszenzzunahme nach Reduktion der Kristalle. Da es sich aber um eine Fluoreszenzerhöhung über den gesamten Bereich handelt, scheint hierfür nicht das Vorhandensein eines weiteren Redoxpartners ursächlich zu sein, sondern eher ein stärkeres Aufschütteln der Kristallsuspension gegenüber der oxidierten Probe. Ob die Lage der Maxima auf bestimmte Redoxpartner hindeutet, oder ob es sich dabei beispielsweise um Pufferartefakte handelt, kann auch hier mit Hilfe der Differenzspektren näher geklärt werden.

Die Fluoreszenzemissionsdifferenzspektren „ox-red“ der Abb. 61 bis 63 geben die Fluoreszenzdifferenz zwischen voll reduzierten und vollständig oxidierten oktaedrischen Kristallen wieder.

**Abb. 61**

Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum „ox-red“ oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps NRRL1555. Anregung bei 470 nm.

**Abb. 62**

Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum „ox-red“ oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps NRRL1555. Anregung bei 380 nm.

Nach Anregung der Fluoreszenz bei 470 nm resultiert ein flavintypisches Emissionsspektrum mit dem Maximum bei 530 nm (Abb. 61). Das starke Rauschen ist auf eine relativ geringe Konzentration flavinartiger Pigmente zurückzuführen. Wie Abb. 62 zeigt, entsteht ein deutliches Maximum bei 440 nm, das pterinartigen Chromophoren zugeordnet werden kann. Daneben resultiert ein Maximum bei 530 nm, welches für Flavine charakteristisch ist. Die geringe

Ausprägung des Maximums bei 530 nm vor dem Hintergrund der relativ verrauschten Spektren scheint auf einer geringeren Konzentration flavinartiger Chromophoren gegenüber den Kristallen der Mutante *C171* zu basieren.

Das Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum der Abb. 63 zeigt nach Anregung bei 350 nm deutlichen pterinartigen Charakter mit dem Maximum bei 440 nm, vergleicht man es mit dem Anregungsspektrum von L-Monapterin in Abb. 74.

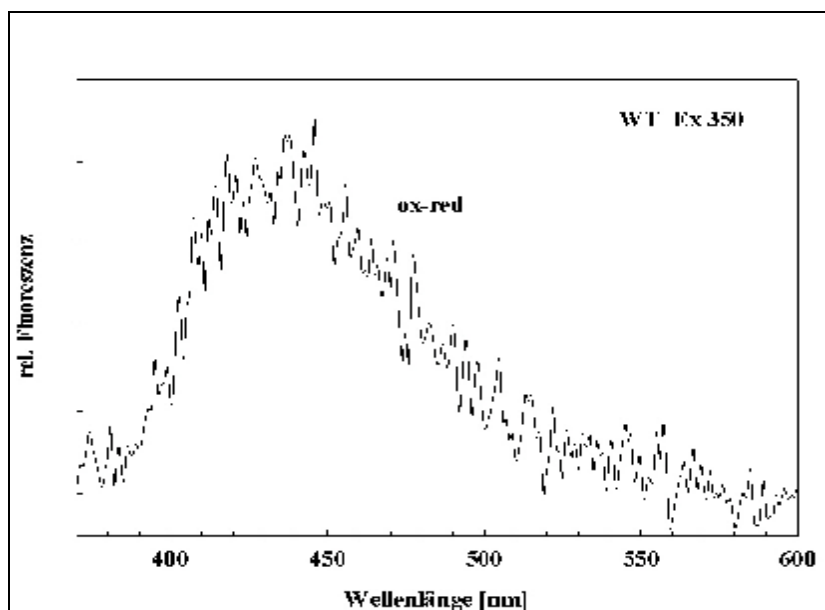


Abb. 63

Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum „ox-red“ oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps *NRRL1555*. Anregung bei 350 nm.

Nach der Analyse der Fluoreszenzemission aller im vollständig oxidierten Zustand befindlicher chromophorer Gruppen dient die Darstellung der Emissionsdifferenzspektren „ox-DTT“ und „DTT-red“ der Untersuchung der chromophoren Gruppen auf die stufenweise Veränderung der Redoxbedingungen.

In Abb. 64 sind die beiden Differenzspektren „ox-DTT“ und „DTT-red“ dargestellt. Das Differenzspektrum „ox-DTT“ lässt in seinem Verlauf trotz der relativ starken Schwankungen ein Maximum bei 530 nm erkennen. Im Differenzspektrum nach Reduktion („DTT-red“) fehlt dieses Maximum. Beiden Differenzspektren fehlt das Maximum bei 560 nm. Dies deutet, wie schon bei der Mutante *C171* in Abb. 42, auf ein Artefakt hin, das durch die Differenzbildung kompensiert wurde. Der Vergleich des Differenzspektrums „ox-DTT“ mit dem Emissionsspektrum von Riboflavin in Abb. 65 zeigt deutlich, dass eine Assoziation der oktaedrischen Kristalle mit einer flavinartigen chromophoren Gruppe angenommen werden kann.

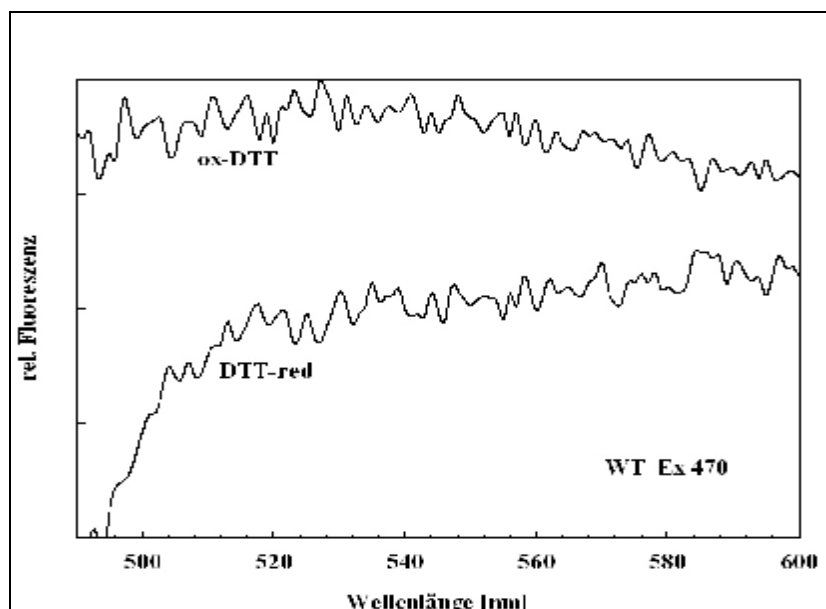


Abb. 64

Fluoreszenzmissionsdifferenzspektren oktaedrischer Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps NRRL1555. Anregung bei 470 nm.

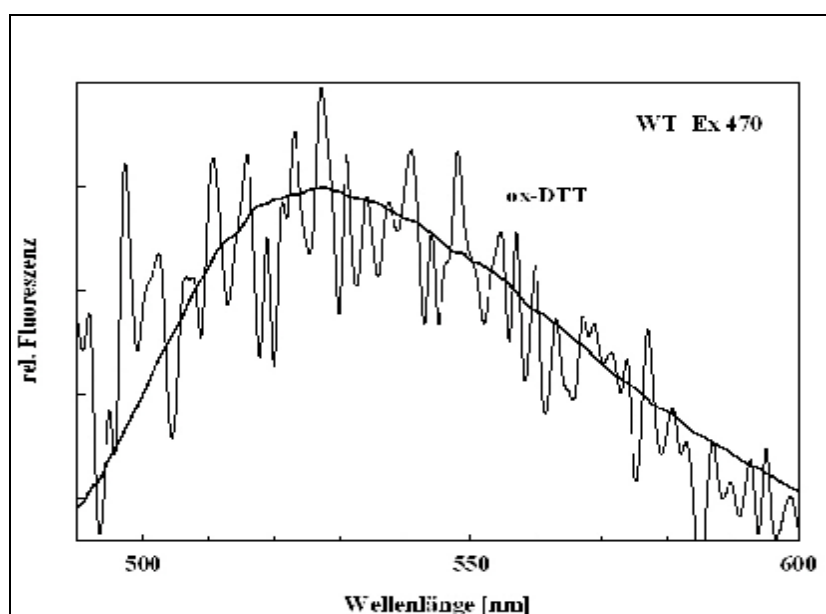


Abb. 65

Fluoreszenzmissionsdifferenzspektrum nach Oxidation teilreduzierter Kristalle des *Phycomyces blakesleeanus*-Wildtyps NRRL1555 im Vergleich mit einem Emissionsspektrum von Riboflavin. Anregung bei 470 nm.

4.1.6 Methanolische Extraktion der Chromophoren

Die bisher erhaltenen Befunde aus den Fluoreszenzuntersuchungen der oktaedrischen Kristalle sowohl des Wildtyps NRRL1555 als auch der Mutante C171 von *Phycomyces blakesleeanus*

zeigen, dass die Kristalle mit mindestens zwei chromophoren Gruppen, einer flavin- und einer pterinartigen Komponente assoziiert sind. Sie geben jedoch keine Auskunft darüber, wie die Bindung zwischen Kristall und Chromophore beschaffen ist. Ob pterin- und flavinartige Chromophore kovalent an die oktaedrischen Kristalle gebunden sind, oder ob es sich um eine nicht-kovalente Bindung handelt, soll mit Hilfe einer Extraktion mit heißem Methanol überprüft werden. Die folgenden Anregungs- und Emissionsspektren wurden allesamt aus dem klaren Überstand nach methanolischer Extraktion der oktaedrischen Kristalle der Mutante *C171* erhalten.

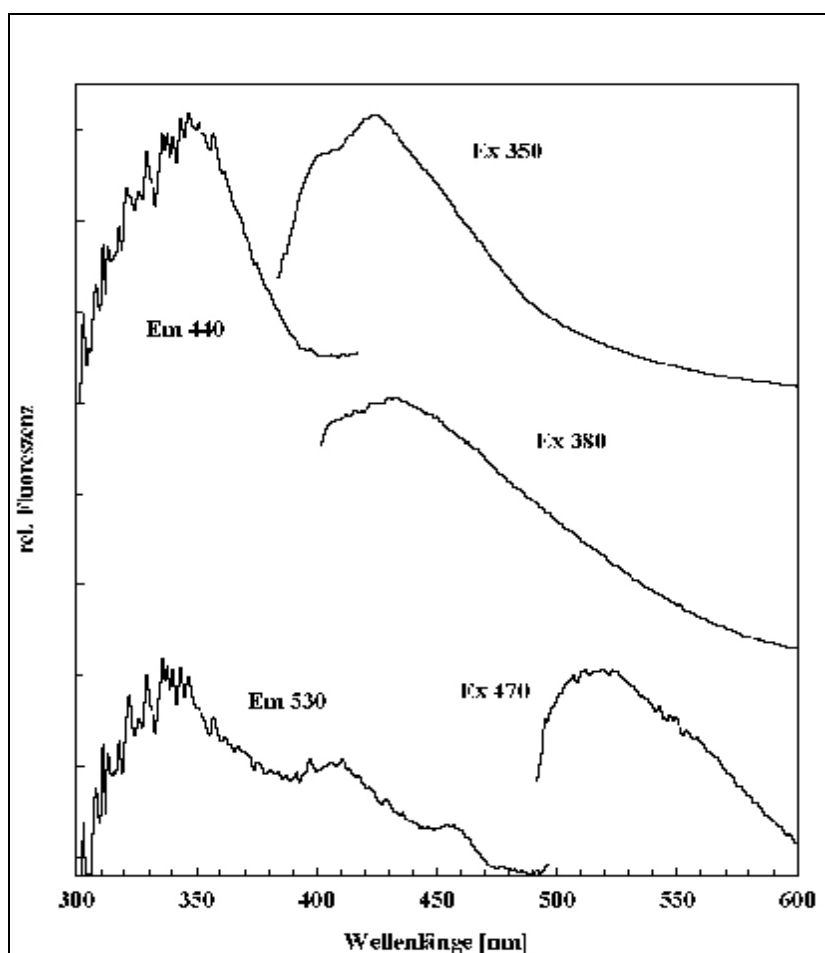


Abb. 66

Fluoreszenzexcitations- und –emissionsspektren des Überstandes aus methanolischer Extraktion oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante *C171*.

Das Fluoreszenzanregungsspektrum mit fixierter Emission bei 530 nm besitzt neben dem Maximum bei 340/350 nm und 450/460 nm ein weiteres bei 410 nm. Mit den Anregungsspektren der Kristalle des Wildtyps und der Mutante *C171* zeigt es eine gute Übereinstimmung. Die Natur des Maximums bei 410 nm kann nicht geklärt werden (siehe unten). Das Emissionsspektrum nach Anregung bei 470 nm zeigt starken flavinartigen Charakter. Auch die Untersuchung auf ein

oder mehrere pterinartige Chromophore spiegelt beim Vergleich der Anregungsspektren mit fixierter Emission bei 440 nm eine deutliche Übereinstimmung der entsprechenden Anregungsspektren untereinander, sowie mit dem Anregungsspektrum des L-Monapterin wider. Wird der methanolische Extrakt bei 350 nm angeregt, so ergibt sich ebenfalls eine für Pterine charakteristische Emission auch in Übereinstimmung mit den Emissionsspektren der nicht extrahierten Kristalle. Auch das Emissionsspektrum nach einer Fluoreszenzanregung bei 380 nm, welche sowohl Pterine als auch Flavine anregt, stimmt mit dem Emissionsspektrum der zuvor besprochenen Kristallaufarbeitungen überein. Neben dem pterineigenen Emissionsmaximum bei etwa 440 nm erscheint auch ein schwaches Maximum bei 530 nm, das für Flavine typisch ist. Die methanolische Extraktion der oktaedrischen Kristalle bestätigt einerseits die pterin- und flavinartige Natur der mit den Kristallen assoziierten chromophoren Gruppen und zeigt andererseits, dass aufgrund der Extrahierbarkeit die Bindung dieser Chromophoren an die Kristalle nicht kovalent ist.

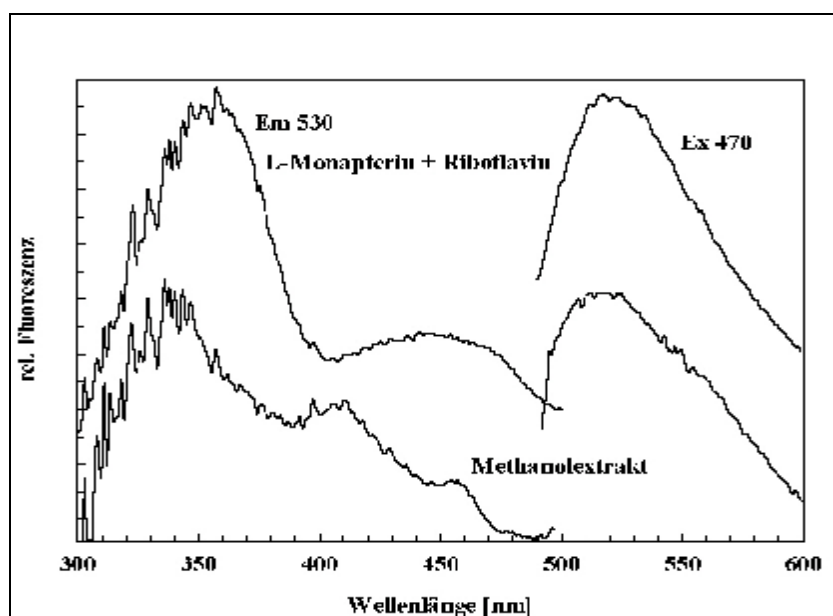


Abb. 67

Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren des Überstandes aus der methanolischen Extraktion oktaedrischer Kristalle der *Phycomyces blakesleeanus*-Mutante C171 mit einem wässrigen Gemisch aus $9,5 \times 10^{-7}$ M L-Monapterin und $4,9 \times 10^{-8}$ M Riboflavin. Emission bei 530 nm, Anregung bei 470 nm.

In Abb. 67 ist ein Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren eines wässrigen Gemisches aus Riboflavin und L-Monapterin und des methanolischen Extraktes dargestellt.

Die Anregungsspektren zeigen gute Übereinstimmung. Die Lage des Maximum im Blaubereich zeigt Unterschiede, die darauf beruhen können, dass durch die methanolische Extraktion neben flavin- und pterinartigen Pigmenten auch andere Komponenten freigesetzt wurden, die zu einer Verzerrung der Spektren führen. Dagegen stimmen die Maxima im kürzerwelligen Bereich gut

überein. Ebenfalls zeigen die Emissionsspektren nach Anregung bei 470 nm, wie sie für Flavine charakteristisch sind, sehr gute Übereinstimmung.

4.1.7 Kontrollspektren mit Referenzsubstanzen

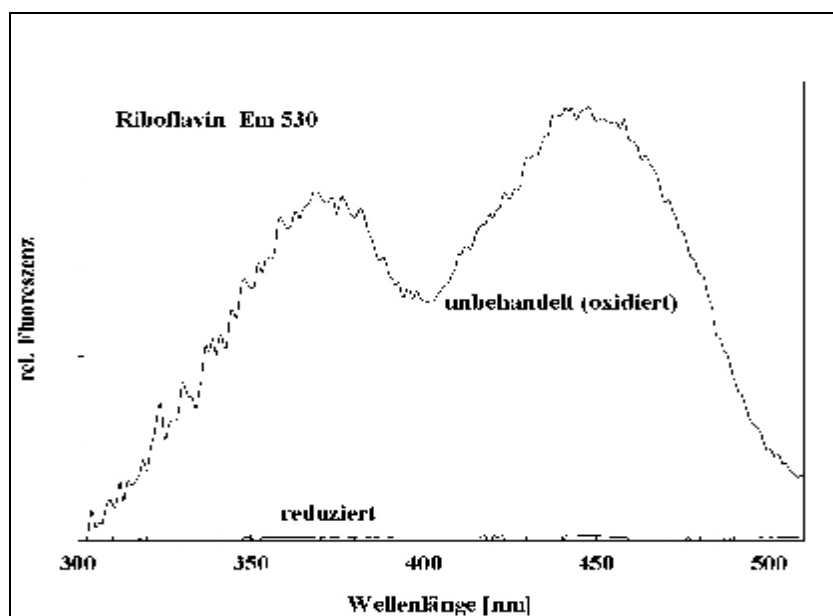
Um die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen der oktaedrischen Kristalle von *Phycomyces blakesleeanus* besser deuten zu können, wurde von Referenzsubstanzen wie Riboflavin, L-Monapterin und NADH ebenfalls die Fluoreszenzanregung und -emission gemessen. Neben den Fluoreszenzspektren der unbehandelten Substanzen, also der wässrigen Lösungen, erfolgte auch die Bestimmung der Anregungs- und Emissionsspektren nach deren Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]$ oder Reduktion mit Natriumdithionit.

4.1.7.1 Kontrollspektren mit Riboflavin

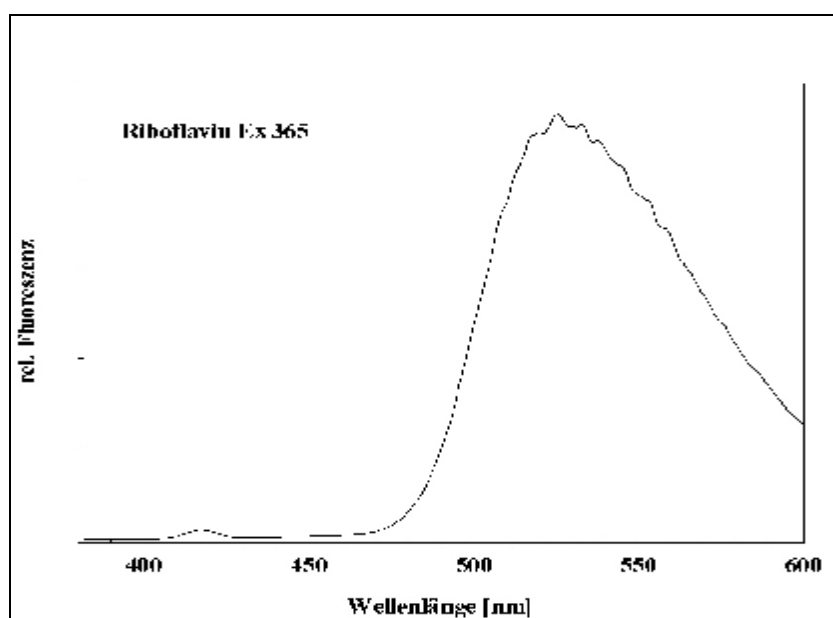
In der folgenden Abbildung sind die Anregungsspektren von Riboflavin in Abhängigkeit vom Redoxzustand dargestellt. Aufgenommen wurde die Fluoreszenzexcitation im Bereich von 300 bis 510 nm mit fixierter Emission bei 530 nm.

Das korrigierte Anregungsspektrum der unbehandelten, im oxidierten Zustand vorliegenden Riboflavinlösung weist zwei Maxima bei 365 und etwa 450 nm auf. Nachdem das Riboflavin mit Dithionit reduziert wurde, verschwand die vorher beobachtete Fluoreszenz vollständig. Dies bedeutet, dass Riboflavin nur im oxidierten Zustand, nicht aber in der reduzierten Form fluoresziert. Ausgehend von dem korrigierten Anregungsspektrum von Riboflavin (Abb. 68) wurde an den Maximumwellenlängen angeregt und die Fluoreszenzemission gemessen. Wie aber aus Abb. 81 hervorgeht, erscheinen im unkorrigierten Anregungsspektrum von Riboflavin zwei weitere Maxima bei 425 und 470 nm. Da die Anregungsspektren direkt während der Messung nicht korrigiert werden können und die Messung der Emissionsspektren umgehend erfolgt, sind zu Vergleichszwecken in den folgenden Abbildungen die jeweiligen Emissionsspektren wiedergegeben.

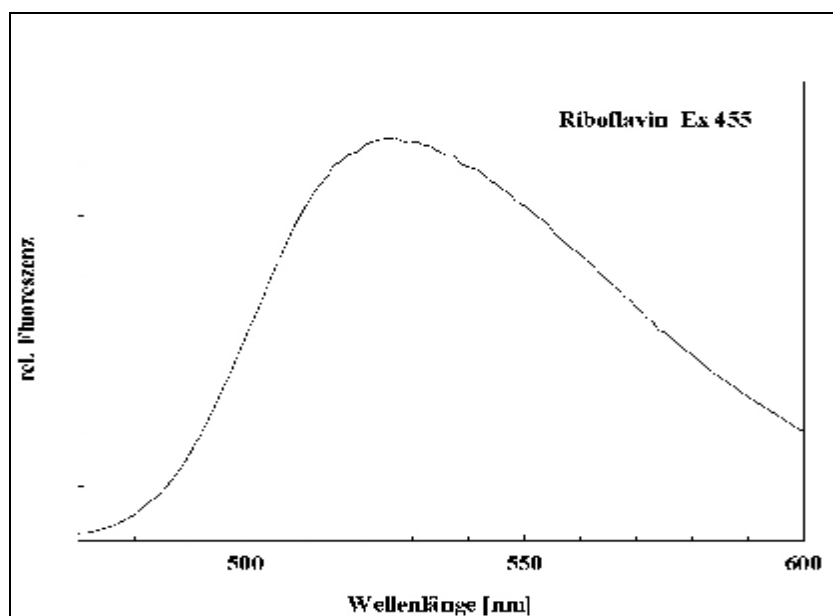
Abb. 69 zeigt das Emissionsspektrum im Bereich von 380 bis 600 nm, nach Anregung bei 365 nm. Das Emissionsspektrum lässt ein starkes Maximum bei 530 nm erkennen.

**Abb. 68**

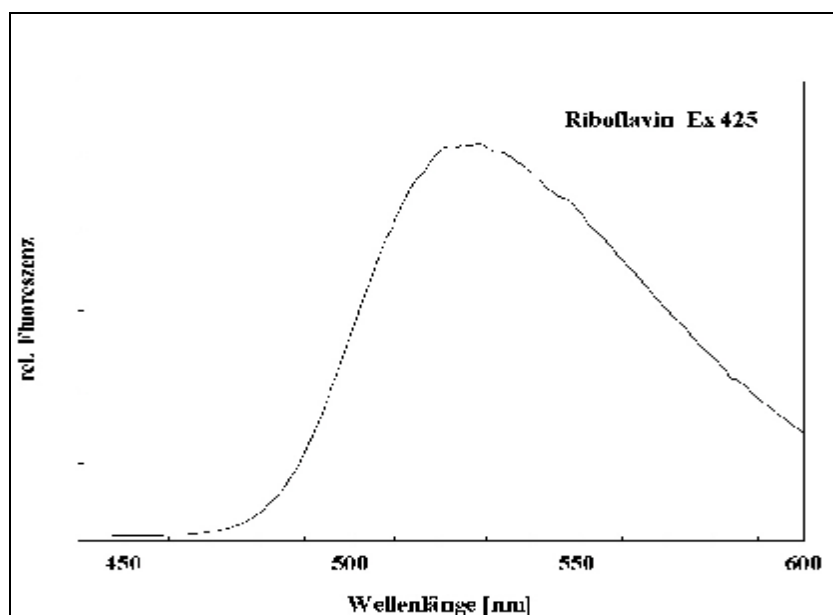
Korrigierte Anregungsspektren von unbehandeltem (oxidiertem) und nachfolgend reduziertem Riboflavin. Emission bei 530 nm.

**Abb. 69**

Emissionsspektrum von unbehandeltem (oxidiertem) Riboflavin. Anregung bei 365 nm.

**Abb. 70**

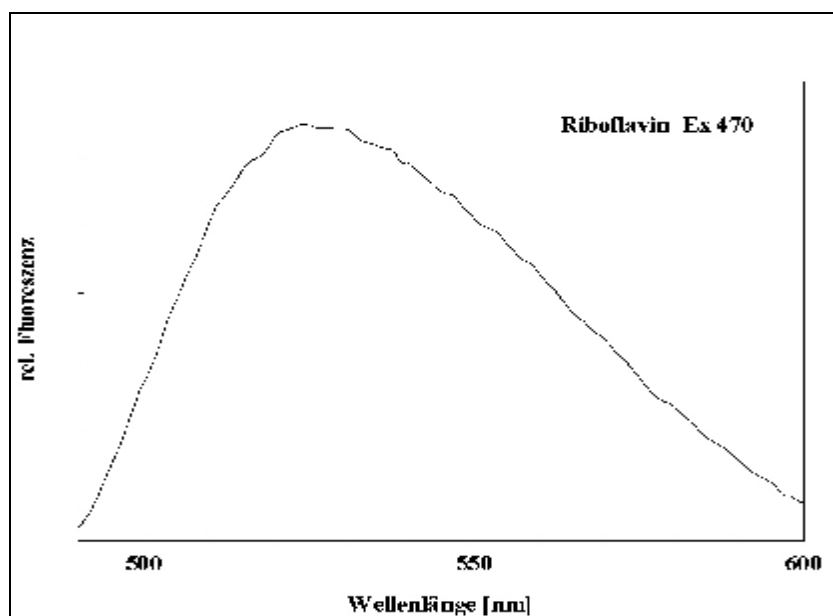
Emissionsspektrum von unbehandeltem (oxidiertem) Riboflavin. Anregung bei 455 nm.

**Abb. 71**

Emissionsspektrum von unbehandeltem (oxidiertem) Riboflavin. Anregung bei 425 nm.

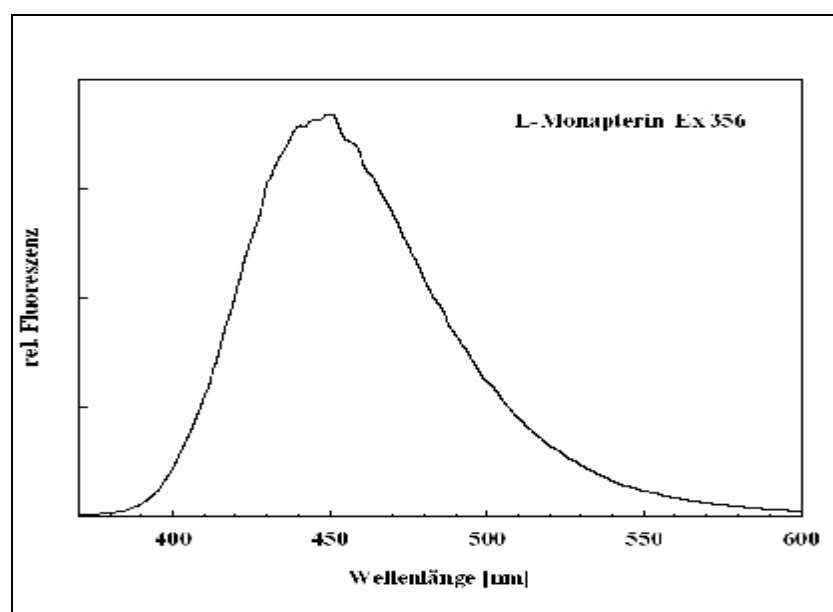
Wird Riboflavin bei 455 nm angeregt, resultiert nach Abb. 70 ebenfalls das Emissionsspektrum mit dem Maximum bei 530 nm.

Nach Anregung bei 425 nm ergibt sich wieder das charakteristische Flavin-Emissionsspektrum mit dem Maximum bei 530 nm, wie in Abb. 71 dargestellt. Ebenso nach Anregung bei 470 nm (Abb. 72).

**Abb. 72**

Emissionsspektrum von unbehandeltem (oxidiertem) Riboflavin. Anregung bei 470 nm.

4.1.7.2 Kontrollspektren mit L-Monapterin

**Abb. 73**

Emissionsspektrum von unbehandeltem (oxidiertem) L-Monapterin. Anregung bei 356 nm.

In Abb. 73 ist das Emissionsspektrum von L-Monapterin als Referenzsubstanz für Pterine dargestellt. Angeregt wurde am Maximum bei 356 nm und die Emission von 370 bis 600 nm gemessen. L-Monapterin zeigt ein ähnliches Emissionsspektrum wie NADH: ein steiler Anstieg der Fluoreszenz bis zu einem Maximum bei 440/450 nm mit einer etwas breiter ausgezogenen

Flanke zum längerwelligen Bereich, die auch noch die Maximumwellenlänge von 530 nm der Flavinemissionsfluoreszenz überstreicht. Das bedeutet, dass bei Messung der Flavinfluoreszenz auch Pterinfluoreszenz detektiert werden kann. Nach Fixierung der Emissionswellenlänge bei 440 nm lassen sich Anregungsspektren des L-Monapterin von 300 bis 420 nm aufnehmen. Abb. 74 zeigt die korrigierten Anregungsspektren von unbehandeltem und reduziertem L-Monapterin. Die Reduktion führt zu einer Löschung der Fluoreszenz mit einer Verschiebung des Maximums von 356 nach 380 nm. Es lässt sich anhand der Anregungsspektren ablesen, dass L-Monapterin im reduzierten Zustand bei 356 nm nicht anregbar ist und damit auch keine Fluoreszenzemission mit einem Maximum bei 440 nm resultieren kann. Unter diesen Bedingungen fluoresziert L-Monapterin nur im oxidierten Zustand, nicht aber nach Reduktion.

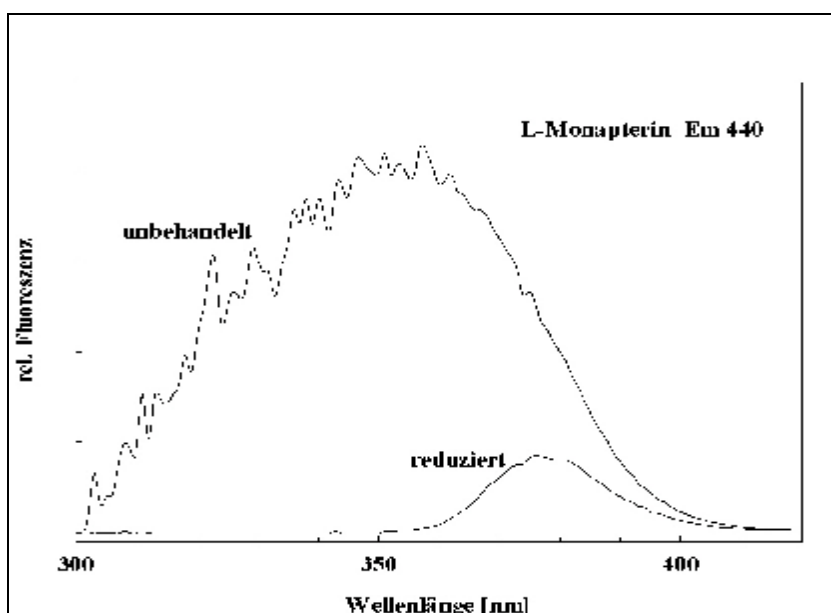


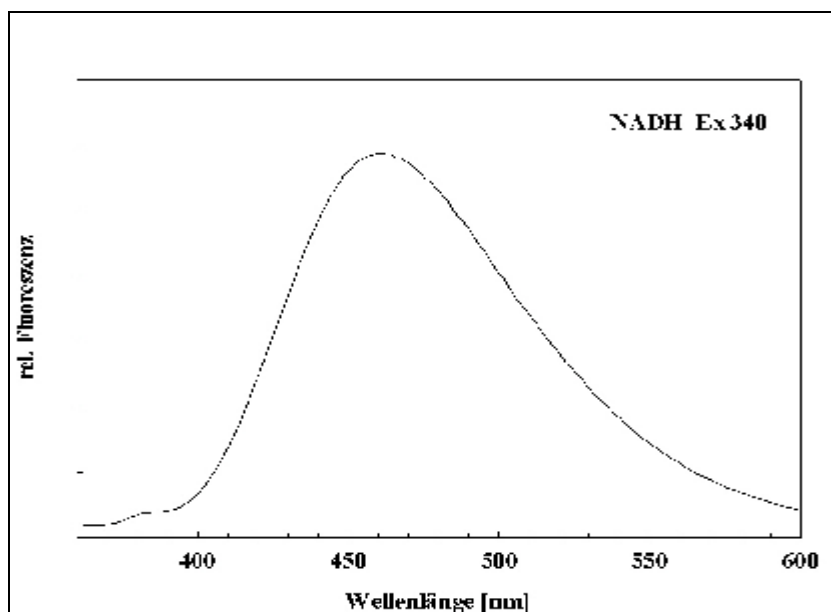
Abb. 74

Korrigierte Anregungsspektren von unbehandeltem und reduziertem L-Monapterin. Emission bei 440 nm.

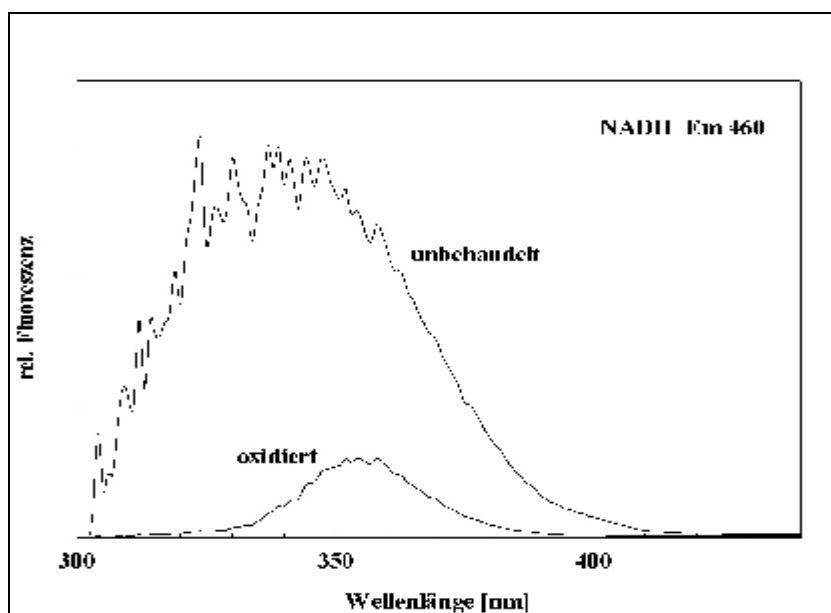
4.1.7.3 Kontrollspektren mit NADH

Abb. 75 gibt das Emissionsspektrum von NADH nach Anregung bei 340 nm wieder. Die Emission wurde im Bereich von 360-600 nm gemessen. Das Maximum der Fluoreszenz befindet sich bei 460 nm. Um die Anregungsfluoreszenz zu messen, wird die Emission bei 460 nm fixiert und das Anregungsspektrum im Bereich von 300 bis 440 nm aufgenommen (Abb. 76).

Es zeigt sich, dass NADH nur als reduzierte Substanz fluoresziert, während die Fluoreszenz nach Oxidation gemessen am reduzierten Zustand nahezu verschwindet. Das Maximum bei 340 nm verschwindet völlig, und es tritt eine Verschiebung hin zu 355-360 nm ein.

**Abb. 75**

Emissionsspektrum von unbehandeltem (reduziertem) NADH. Anregung bei 340 nm.

**Abb. 76**

Korrigierte Anregungsspektren von unbehandeltem (reduziertem) und oxidiertem NADH. Emission bei 460 nm.

4.1.8 Kontrollspektren mit Puffer

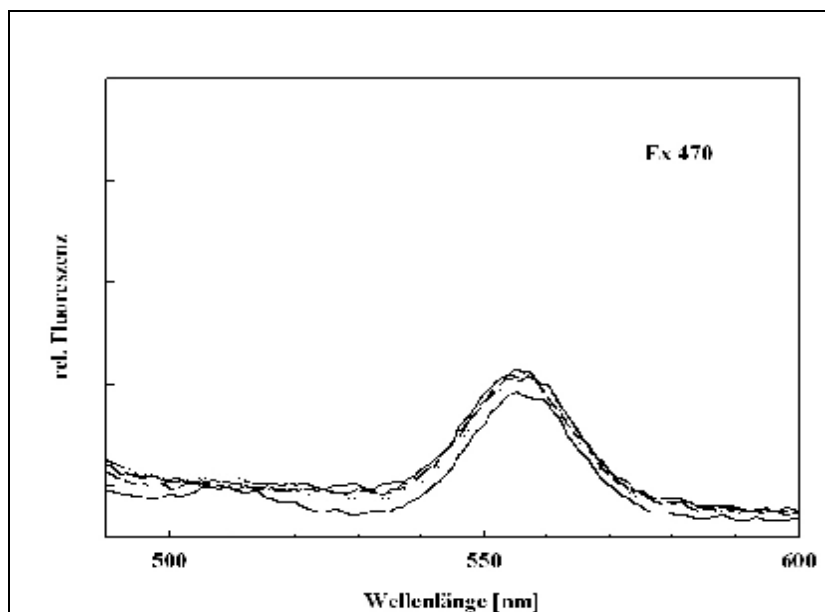


Abb. 77

Emissionsspektren von Natriumphosphatpuffer/ddH₂O mit allen Zusätzen (von unten nach oben in der Reihenfolge der Behandlung der oktaedrischen Kristalle): ddH₂O, Puffer alleine, Puffer mit DTT, Puffer mit DTT und K₃[Fe(CN)₆], Puffer mit DTT, K₃[Fe(CN)₆] und Natriumdithionit. Anregung bei 470 nm.

Abb. 77 stellt die Fluoreszenzemissionsspektren des Aufschlusspuffers und seiner Kombinationen mit den verschiedenen Reduktions- und Oxidationsmitteln, sowie des Lösungsmittels ddH₂O dar. Aus dem einheitlichen Verlauf aller Spektren lässt sich ablesen, dass das Maximum bei 560 nm offenbar ein Artefakt ist. Darüber hinaus wird deutlich, dass dieses Artefakt durch ddH₂O hervorgerufen wurde (unterstes Spektrum). Die bei den Untersuchungen der oktaedrischen Kristalle auf Pterine entstandenen möglichen Artefakte nach Reduktion erforderten entsprechende Kontrollen. Dazu wurden Anregungsspektren mit fixierter Emission bei 440 nm und die korrespondierenden Emissionsspektren vom Natriumphosphatpuffer mit allen Zusätzen erzeugt.

Das Anregungsspektrum der Abb. 78 zeigt sehr deutlich, dass lediglich nach Reduktion mit Natriumdithionit eine starke Fluoreszenz im Bereich 380/390 nm mit einer Schulter bei 400 nm auftritt. Die Fluoreszenz der übrigen Kombinationen liegt, gemessen an der voll reduzierten Probe, auf mehr oder weniger einheitlichem niedrigem Niveau. Die Behandlung des Puffers mit Reduktions- und Oxidationsmitteln entspricht in Konzentration und Reihenfolge der der oktaedrischen Kristalle.

Das korrespondierende Emissionsspektrum zeigt im Bereich von 420 bis 440 nm ebenfalls eine starke Fluoreszenz. Diese Fluoreszenz ist nur bei der voll reduzierten Probe (Puffer mit DTT, K₃[Fe(CN)₆] und Dithionit) zu erkennen. Alle übrigen Kombinationen von Puffer, Reduktions-

und Oxidationsmitteln verhalten sich analog der Anregungsspektren in Abb. 79 gleich. Dieses ausgeprägte Fluoreszenzmaximum ist demnach ein Artefakt.

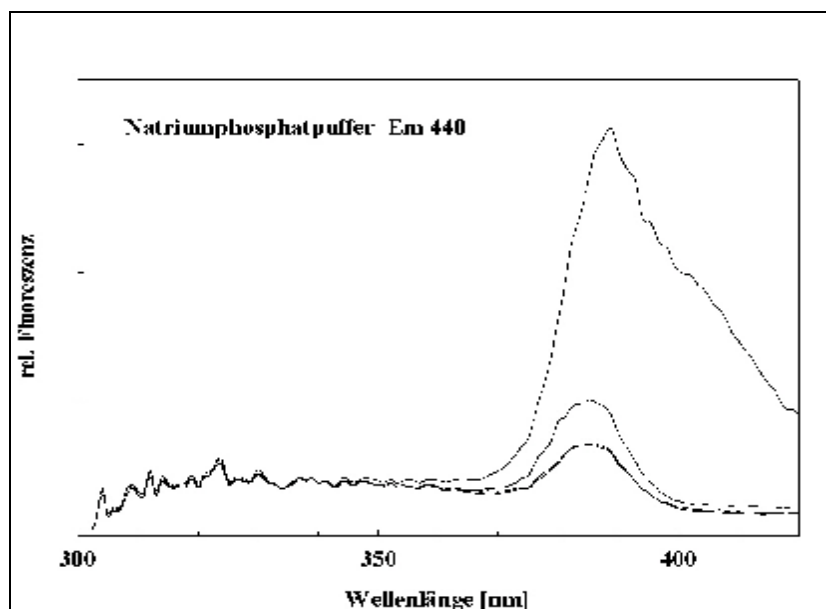


Abb. 78

Korrigierte Anregungsspektren von Natriumphosphatpuffer mit allen Zusätzen (von unten nach oben): Puffer alleine, Puffer mit DTT, Puffer mit DTT und $K_3[Fe(CN)_6]$, Puffer mit DTT, $K_3[Fe(CN)_6]$ und Natriumdithionit. Emission bei 440 nm.

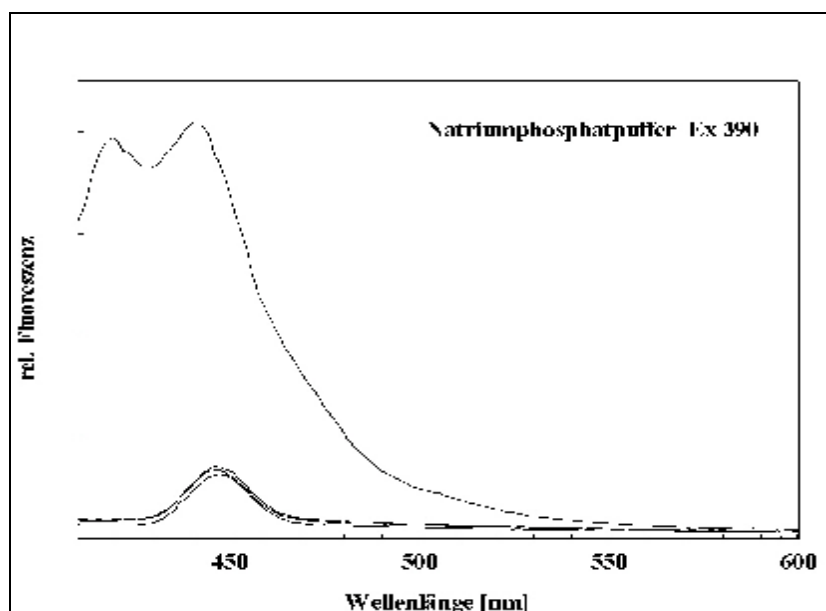


Abb. 79

Emissionsspektren von Natriumphosphatpuffer mit allen Zusätzen (von unten nach oben): Puffer alleine, Puffer mit DTT, Puffer mit DTT und $K_3[Fe(CN)_6]$, Puffer mit DTT, $K_3[Fe(CN)_6]$ und Natriumdithionit. Anregung bei 390 nm.

4.1.9 Polarisationspektren

Um Hinweise auf die tatsächliche Bindung von Chromophoren an die oktaedrischen Kristalle des Wildtyps und der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus* zu erhalten, wurden von den oxidierten Kristallen Fluoreszenz-Polarisationsspektren erzeugt.

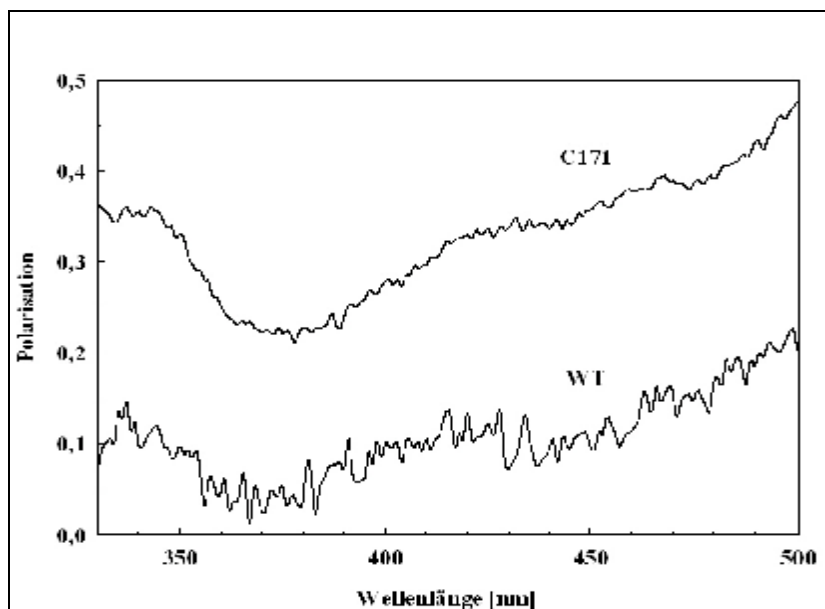


Abb. 80

Polarisationsspektren oktaedrischer Kristalle des Wildtyps *NRRL1555* und der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus*.

Abb. 80 zeigt die beiden Polarisationspektren der oktaedrischen Kristalle des Wildtyps *NRRL1555* und der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus*. Es wird deutlich, dass die Fluoreszenzanregung für die Kristalle stark polarisiert ist. Es zeigt sich weiter die Wellenlängenabhängigkeit der Polarisation. Die Polarisation bei den Kristallen der Mutante *C171* erreicht bis 345 nm auf einem Plateau Werte von 0,36, sinkt dann bis etwa 365 nm auf einen Wert von 0,22. Es folgt ab 385 nm eine stetige Zunahme der Polarisation auf 0,32-0,33 bis 425 nm. Bis etwa 447 nm verändert sich der Wert nahezu nicht, steigt dann aber wiederum an auf 0,36-0,37 und verändert sich im Bereich von 453-480 nm nicht. Ein weiterer stetiger Anstieg der Polarisation schließt sich an. Das Polarisationspektrum der Kristalle des Wildtyps zeigt den gleichen Verlauf, jedoch parallel verschoben zu niedrigeren Werten. Weiter wird deutlich, dass das Polarisationspektrum der Kristalle des Wildtyps insgesamt unruhiger und unschärfer ist. Dies könnte ein Indiz für eine geringere Ausbeute an Chromophoren sein. Darüberhinaus ist zu beobachten, dass die Differenzen zwischen den Plateaus etwas kleiner sind als bei den Kristallen der Mutante *C171*. Der Verlauf der Polarisationspektren deutet ebenfalls darauf hin, dass neben

einem flavinartigen Pigment noch eine zweite Chromophore an die Kristalle gebunden ist. Wäre nur eine flavinartige Chromophore an die oktaedrischen Kristalle gebunden, würde sich dies nur durch zwei verschiedene Polarisationswerte bei 370 und 450 nm ausdrücken. Das Plateau bei 340 nm aber weist auf eine zweite, möglicherweise pterinartige Komponente hin.

4.1.10 Korrektur der Anregungsspektren

Wie in Abschnitt 3.5.4 (Gleichung 6) beschrieben, dient die Korrektur der Fluoreszenzanregungsspektren der Kompensation von Verzerrungen, die durch Lampe und Gittermonochromatoren des Fluoreszenzspektrometers entstanden sind. Abb. 81 illustriert den Effekt der Korrektur anhand von Riboflavin. Die Unschärfe im Bereich unterhalb von 370 nm resultiert aus der Absorption der geringen Konzentration von 10^{-6} M.

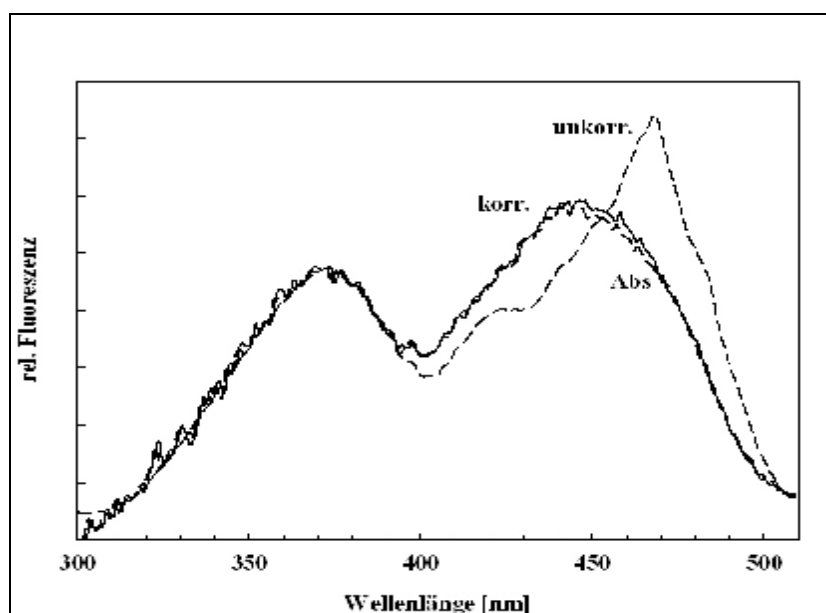


Abb. 81

Vergleich des korrigierten und unkorrigierten Anregungsspektrums mit dem Absorptionsspektrum von 10^{-6} M Riboflavin in 0,1M Natriumphosphatpuffer.

Das mit „unkorr.“ bezeichnete Spektrum repräsentiert die direkt gemessene Fluoreszenzanregung. Aus Multiplikation des unkorrigierten Anregungsspektrums mit dem Korrekturfaktor resultiert das ‚wirkliche‘ Anregungsspektrum von Riboflavin. Die Mehrgipfeligkeit des unkorrigierten Rohspektrums verschwindet. Die Maxima bei 425 und 470 nm erscheinen im korrigierten Anregungsspektrum nicht mehr. Dagegen resultiert, wie aus dem

Vergleich mit dem Absorptionsspektrum ersichtlich, den tatsächlichen Verhältnissen entsprechend die Zweigipfeligkeit mit einem Maximum bei 370 und 450 nm.

4.1.11 Dichtebestimmung der oktaedrischen Kristalle

Die Dichte der oktaedrischen Kristalle aus *Phycomyces blakesleeanus* wurde mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation und nachfolgender refraktometrischer Bestimmung ermittelt (siehe Material und Methoden). Von jeder 500µl-Fraktion des Gradienten wurden Anregungsspektren mit fixierten Emissionen bei 440 und 530 nm zur Überprüfung auf Anwesenheit von pterin- bzw. flavinartigen Chromophoren aufgenommen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte einerseits direkt (mit DTT teilreduzierte Kristalle) und andererseits nach Oxidation. Die Fluoreszenzintensitäten der Maxima der Differenzanregungsspektren bei 340 und 470 nm dienten zur quantitativen Abschätzung der Chromophoren. Die Abb. 82 gibt die Verteilung der Summe der Fluoreszenzemission bei 440 nm (pterinartige) und 530 nm (flavinartige Pigmente) entlang des Gradienten wieder.

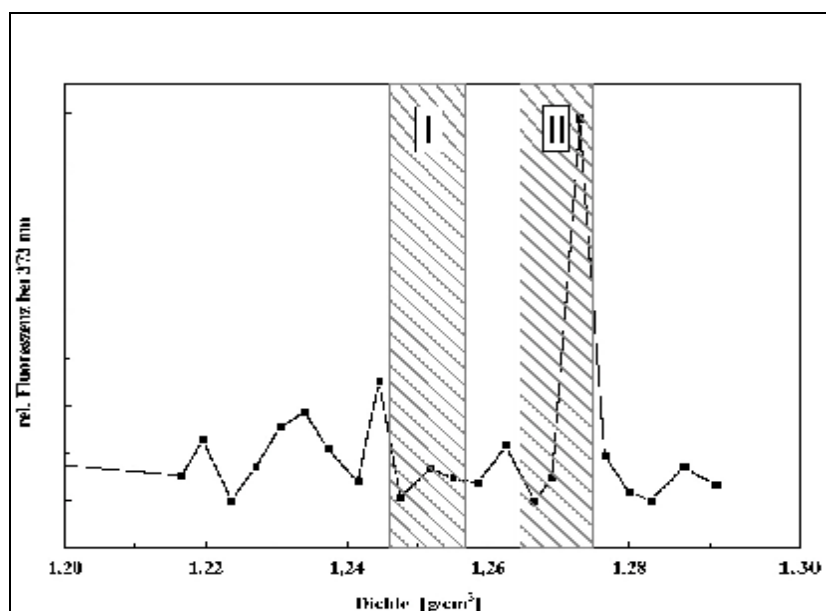


Abb. 82

Dichteverteilung der 500µl-Fractionen (Kästchen) entlang des Nycodenzgradienten in Abhängigkeit von der Summe der Fluoreszenzemission für pterin- (440 nm) und flavinartige Pigmente (530 nm). Die schraffierten Flächen markieren die Fraktionen mit oktaedrischen Kristallen der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus*.

Nach mikroskopischer Kontrolle konnten Kristalle nur in den Fraktionen gefunden werden, die in Abb. 82 unter den schraffierten Flächen liegen. Es konnten je drei Fraktionen mit Kristallen isoliert werden. Diese sind aufgrund ihrer mittleren Dichte in zwei Gruppen zu unterteilen:

Gruppe I mit einer Dichte von $1,247 \text{ g/cm}^3$ und Gruppe II mit $1,271 \text{ g/cm}^3$. Die Fluoreszenzemission bleibt entlang des Gradienten mehr oder weniger gleich. Lediglich in Gruppe II befand sich eine Kristallfraktion mit einer starken Fluoreszenzzunahme. Die aus der Fluoreszenz abzuleitende Chromophorenkonzentration korreliert demnach nicht mit der Dichte der oktaedrischen Kristalle.

4.1.12 Riboflavin-Bindungsexperimente

4.1.12.1 Bindungsexperimente mit unbehandelten Kristallen

Mit Hilfe der Bindungsexperimente sollte überprüft werden, ob flavinartige Pigmente an die oktaedrischen Kristalle von *Phycomyces blakesleeanus* binden können. Dazu wurden isolierte Kristalle des Wildtyps *NRRL1555* und der Mutante *C171* mit exogen angebotenem Riboflavin verschiedener Konzentrationen inkubiert.

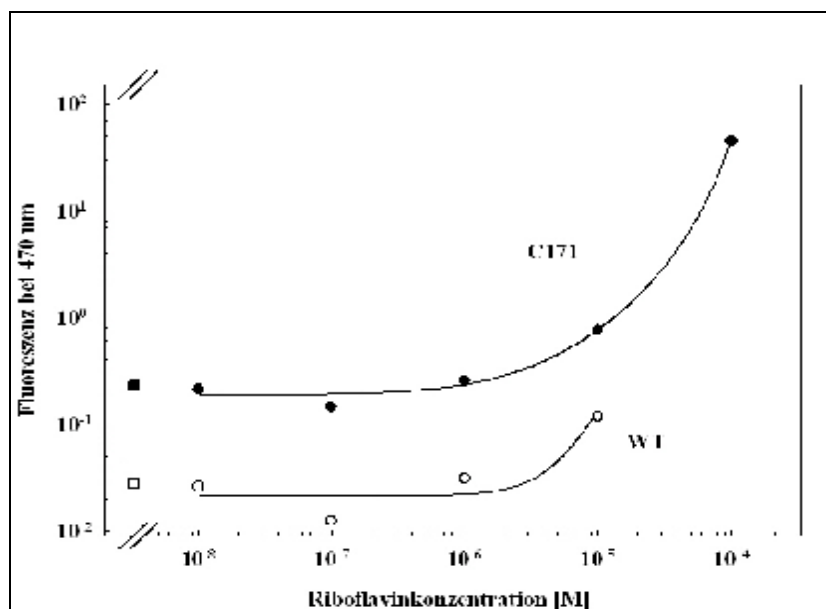


Abb. 83

Riboflavin-Bindungsexperiment mit oktaedrischen Kristallen des Wildtyps *NRRL1555* und der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus*. Erstes Symbol links außen repräsentiert die unbehandelten Kristalle.

Abb. 83 zeigt die Beziehung zwischen der Konzentration exogen angebotenen Riboflavins im Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-4} M und der Fluoreszenzexcitation bei 470 nm bei fixierter Emission bei 530 nm. Beide Stämme zeigen erst ab einer Riboflavinkonzentration oberhalb von 10^{-6} M einen signifikanten Anstieg in der Fluoreszenz bei 470 nm. Bei den Kristallen der

Mutante *C171* liegt die niedrigste Fluoreszenz um eine Zehnerpotenz über dem Basiswert der Wildtypkristalle. In ihrer Bindungscharakteristik scheinen sich die Kristalle vom Wildtyp und von der Mutante *C171* nicht zu unterscheiden. Die Riboflavinbindung scheint in beiden Fällen gleich stark zu sein. Bei *C171* erfährt die Bindung ab 10^{-4} M exogenem Riboflavin eine Sättigung. Aufgrund von Materialverlusten bei den wiederholten Waschungen der Kristalle konnten keine Messdaten oberhalb einer exogenen Riboflavinkonzentration von 10^{-5} M für den Wildtyp erhalten werden. Aus dem gleichen Grund sind in der folgenden Abbildung nur die Ergebnisse für die Kristalle der Mutante *C171* wiedergegeben. In Abb. 84 ist dargestellt, wie viel Riboflavin von den oktaedrischen Kristallen in Abhängigkeit von der Konzentration des exogen angebotenen Riboflavins gebunden wird.

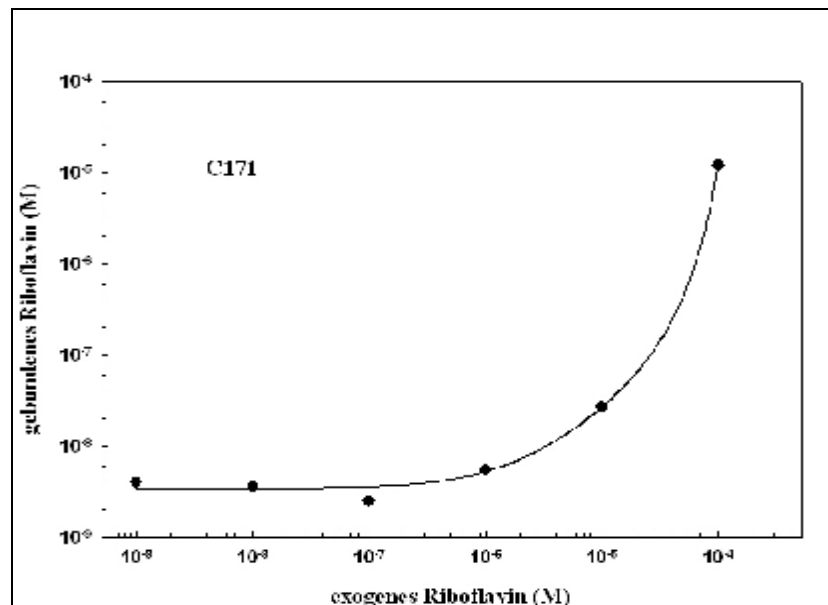


Abb. 84

Bindungsexperiment mit oktaedrischen Kristallen der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeana*. Konzentration gebundenen Riboflavins in Abhängigkeit von Konzentration exogen angebotenen Riboflavins.

Die Konzentration des gebundenen Riboflavins steigt nicht mit der Riboflavinkonzentration, mit der die Kristalle inkubiert wurden. Bis zu einer Konzentration von etwa 3×10^{-7} M ändert sich die Menge gebundenen Riboflavins nicht. Erst darüber erfolgt ein exponentieller Anstieg. Die Erhöhung der Konzentration des exogenen Riboflavins von 10^{-5} M auf 10^{-4} M bewirkt eine Steigerung der Bindung um den Faktor 250.

4.1.12.2 Bindungsexperimente in Abhängigkeit vom Redoxzustand

Zur Überprüfung der Bindung von exogen angebotenem Riboflavin an die oktaedrischen Kristalle in Abhängigkeit von deren Redoxzustand wurden die Kristalle der Mutante *C171* sowohl im oxidierten, als auch reduzierten Zustand mit Riboflavin im Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-4} M inkubiert. Abb. 85 stellt die Anregungsspektren mit fixierter Emission bei 530 nm dar. Anhand der Maxima bei 370 und 470 nm zeigt sich einerseits eine starke Zunahme der Bindung von Riboflavin erst ab einer Konzentration von 10^{-6} M. Für alle Konzentrationen gilt, dass die Kristalle im reduzierten Zustand mehr Riboflavin binden als nach Oxidation, wenn auch die Unterschiede in den Absolutwerten nicht so groß sind. Dies erhärtet die bisherigen Schlussfolgerungen, wonach die flavinartige Chromophore ihre Bindung zu den oktaedrischen Kristallen durch Oxidation löst, eine Reduktion aber die Assoziation fördert.

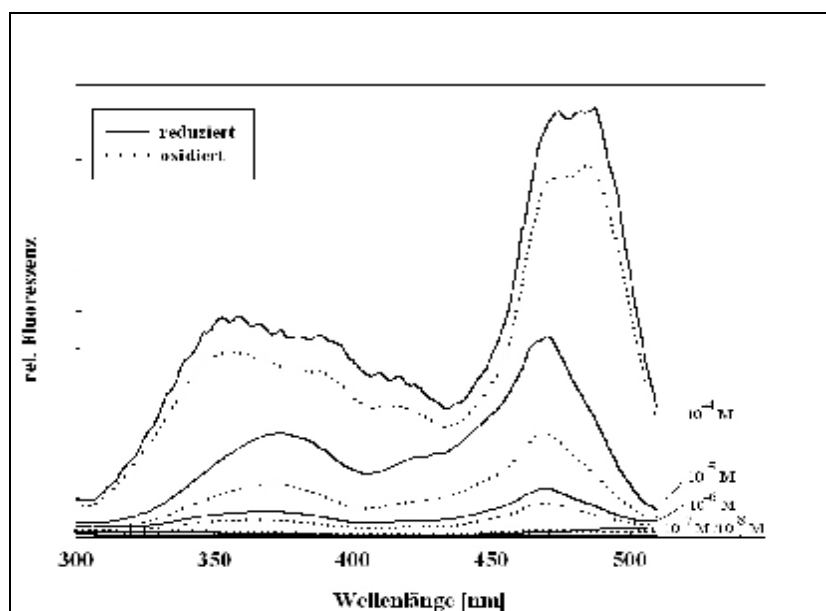


Abb. 85

Bindungsexperiment mit oktaedrischen Kristallen der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeana*. Riboflavinbindung in Abhängigkeit vom Redoxzustand der Kristalle.

Basierend auf dem in Abb. 85 illustrierten Experiment sind in der folgenden Abbildung die Bindungskurven von reduzierten und oxidierten Kristallen dargestellt. Als Grundlage für die Ermittlung der Riboflavinkonzentration diente die Fluoreszenz bei 470 nm aus der Eichgerade mit definierten Riboflavinkonzentrationen. Es zeigt sich deutlich, dass zuvor reduzierte Kristalle mehr Riboflavin binden als oxidierte Kristalle. Oberhalb von 10^{-5} M angebotenem Riboflavin scheint die Bindung sowohl bei reduzierten als auch bei oxidierten Kristallen eine Sättigung zu erfahren. Die oxidierten Kristalle binden Riboflavin erst ab einer exogenen Konzentration von

10^{-8} M. Da Riboflavin erst ab dieser Konzentration angeboten wurde, ist die Schwellenwertkonzentration für die reduzierten Kristalle hier nicht bestimmbar. In Abb. 87 ist der Scatchard-Plot der in Abb. 86 gezeigten Ergebnisse dargestellt.

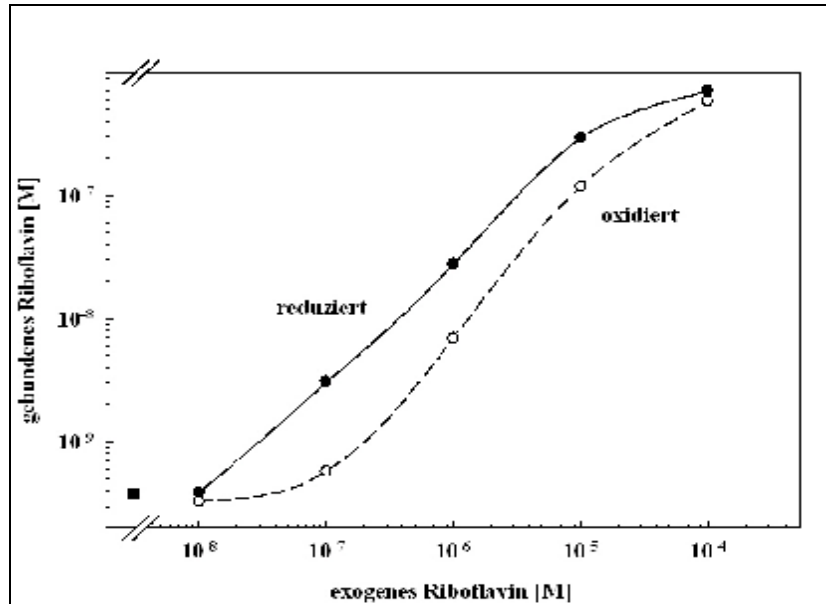


Abb. 86

Bindungsexperiment mit zuvor oxidierten, bzw. reduzierten oktaedrischen Kristallen der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeana*. Konzentration gebundenen Riboflavins in Abhängigkeit von Konzentration exogen angebotenen Riboflavins (quadratisches Symbol: unbehandelte Kristalle).

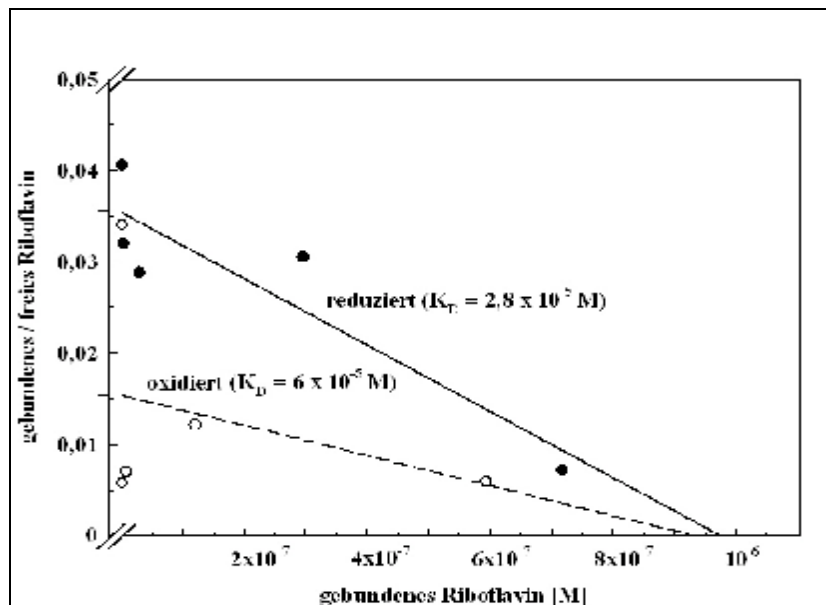


Abb. 87

Scatchard-Plot der Kurven des in Abbildung 86 dargestellten Bindungsexperimentes. Zur besseren Lesbarkeit ist die Ordinate etwas abgerückt.

Für die reduzierten Proteinkristalle ergibt sich eine Dissoziationskonstante der Riboflavinbindung von $2,8 \times 10^{-5} \text{ M}$. Die Dissoziationskonstante der oxidierten Kristalle liegt bei $6 \times 10^{-5} \text{ M}$. Die Zahl der Bindungsstellen pro Kristall beträgt bei den reduzierten Kristallen $7,7 \times 10^8$ und im Falle oxidierten Kristalle $7,4 \times 10^8$.

Eine weitere Bestätigung der Bindung von Riboflavin an die oktaedrischen Kristalle stellt Abb. 88 dar. Die Kristalle wurden nach Inkubation in 10^{-6} M Riboflavin, wie in Abschnitt 3.6.4 beschrieben, durch ein Kissen aus 50% (w/v) Saccharose zentrifugiert. Damit war gewährleistet, dass nur gebundenes Riboflavin nach diesem Reinigungsprozess nachgewiesen werden konnte. Die in Natriumphosphatpuffer resuspendierten Kristalle wurden sofort fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Diese Messung wurde nach zweimaligem Waschen der Kristalle in Natriumphosphatpuffer wiederholt.

Abb. 88 zeigt überaus deutlich, dass nach Zentrifugation Riboflavin an den Kristallen gebunden bleibt. Das ungebundene Riboflavin konnte aufgrund seiner geringeren Dichte nicht durch die Saccharose hindurchtreten. Dass die Kristalle Riboflavin binden können, wird auch durch das zweimalige Waschen der Kristalle bestätigt. Dass es sich hierbei tatsächlich um Flavinfloreszenz handelt, zeigt der Vergleich mit dem Anregungsspektrum der Inkubationslösung in Abb. 89.

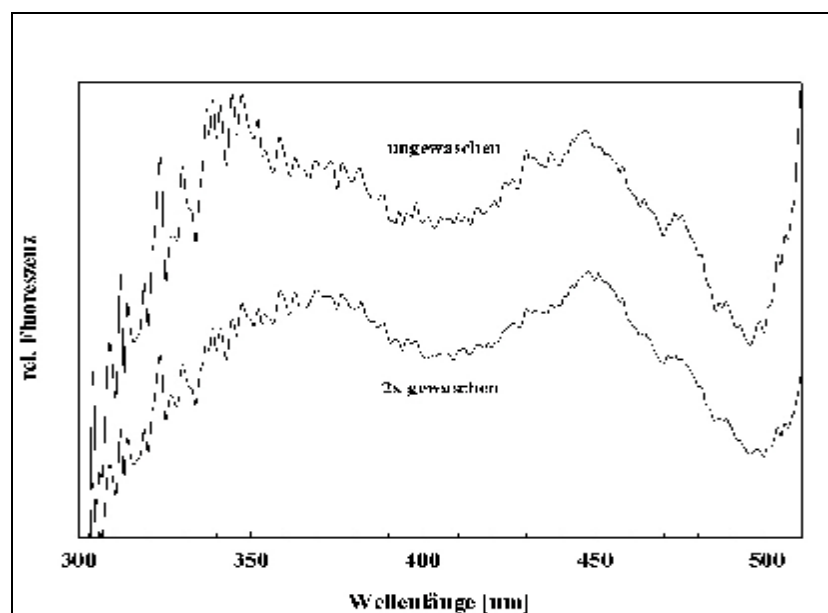
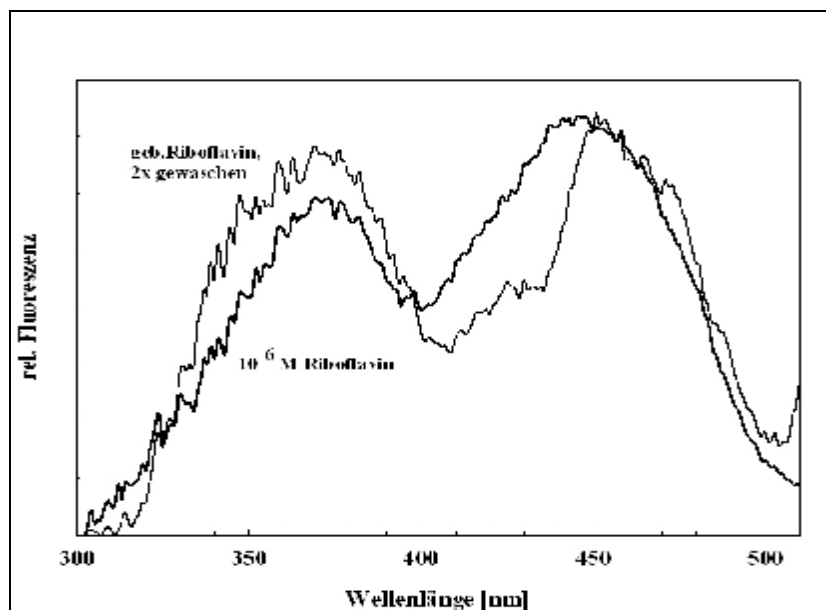


Abb. 88

Bindungsexperiment mit oktaedrischen Kristallen der Mutante *C17I* von *Phycomyces blakesleeana* nach differenzieller Zentrifugation über Saccharosekissen. Korrigierte Anregungsspektren mit Emission bei 530 nm.

**Abb. 89**

Vergleich der gewaschenen Kristalle der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus* aus dem Bindungsexperiment nach differentieller Zentrifugation über Saccharosekissen mit 10^{-6} M Riboflavin. Korrigierte Anregungsspektren mit Emission bei 530 nm.

4.1.13 Stöchiometrie der am Kristall gebundenen flavinartigen Chromophore

Die bisher erhaltenen Befunde ermöglichen Berechnungen zur Stöchiometrie der an die oktaedrischen Kristalle gebundenen flavinartigen Chromophore.

Aus der Dichte von $1,26 \text{ g/cm}^3$ und dem mittleren Volumen von $9,96 \text{ }\mu\text{m}^3$ (EIBEL et al, 2000) ergibt sich die mittlere Masse eines oktaedrischen Kristalls von *Phycomyces blakesleeanus* von $1,26 \times 10^{-5} \text{ }\mu\text{g}$.

Die Proteinmenge von $1 \text{ }\mu\text{l}$ Kristallsuspension betrug nach der CBQCA-Proteinbestimmung $90,19 \text{ }\mu\text{g}$.

Aus dem in den Bindungsexperimenten eingesetzten Probenvolumen von $170 \text{ }\mu\text{l}$ resultiert demnach eine Kristallmenge von $1,2 \times 10^6$ / Probe

Anhand der Kalibriergeraden resultiert aus einer Konzentration von exogenem Riboflavin von 10^{-4} M für die Kristalle der Mutante *C171* eine Menge gebundenen Riboflavins von 10^{-5} M . Dies entspricht 10^{15} Molekülen. Daraus resultiert eine *in vitro*-Besetzungszahl (Anzahl der Riboflavinmoleküle / Kristall) von 8×10^8 Molekülen des angebotenen 10^{-4} M Riboflavins.

Aus den Bindungsexperimente mit zuvor reduzierten bzw. oxidierten Kristallen errechnet sich mittels Scatchard-Plot (Abb.87) die Zahl der Bindungsstellen pro Kristall für Riboflavin bei reduzierten Kristallen von $7,7 \times 10^8$ und für oxidierte Kristalle von $7,4 \times 10^8$.

Nach DOHRMANN (1983) beträgt die Riboflavinkonzentration *in situ* mindestens etwa 3×10^{-7} M. Die *in situ*-Besetzungszahl eines Kristalls der Mutante *C171* beträgt demnach 10^6 Moleküle Riboflavin.

Wird für ein parakristallines Proteinaggregat ein mittleres Molekulargewicht von 50 kDa angenommen, setzt sich nach Gleichung 17 ein Kristall aus $1,52 \times 10^8$ Proteinen zusammen.

$$\text{Gl. 17: } \frac{\text{mittlere Masse eines Kristalls}}{\text{mittleres Molekulargewicht eines Proteinaggregates}} = \text{Proteine / Kristall}$$

$$\text{Gl. 18: } \frac{\text{in vitro - Besetzungszahl}}{\text{Proteine / Kristall}} = \text{gebundene Riboflavinmoleküle / Proteine}$$

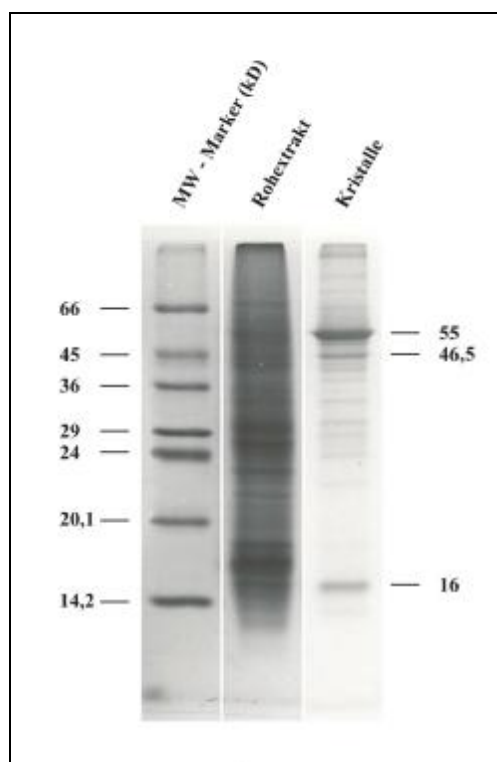
Unter der Annahme, dass die Monomere eines Proteinkristalls zu den unterschiedlichen Chromophoren gleiche Affinität besitzen, bindet ein Monomer nach Gleichung 18 5,26 Moleküle des 10^{-4} M Riboflavins.

4.2 Molekularbiologie

4.2.1 Denaturierende SDS-PAGE der oktaedrischen Kristalle

Um die Aminosäuresequenz der oktaedrischen Proteinkristalle von *Phycomyces blakesleeianus* ermitteln zu können, wurden die isolierten und gereinigten Kristalle in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Abb. 89 zeigt das Elektrophorese-Ergebnis.

Neben den Molekulargewichtsmarkern (links) und dem Rohextrakt (Mitte) sind in der rechten Spur die denaturierten oktaedrischen Proteinkristalle dargestellt. Offenbar sind die oktaedrischen Proteinkristalle in drei Untereinheiten separiert worden, wovon eine durch eine sehr intensive Bande bei etwa 55 kDa repräsentiert wird. Eine kleinere Untereinheit zeigte eine schwächere Farbreaktion bei 46,5 kDa und eine weitere Bande erscheint bei 16 kDa. Die drei Untereinheiten erhielten entsprechend ihrem Molekulargewichte die Bezeichnungen *VFphy55*, *VFphy46* und *VFphy16*. Nach dem Westerntransfer und der Isolierung der Einzelbanden wurden die Untereinheiten N-terminal ansequenziert.

**Abb. 90**

12%-SDS-PAGE des Rohextraktes (Mitte) und oktaedrischer Kristalle (rechts) der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus*.

4.2.2 AS-Sequenzierung

Die aus der N-terminalen Sequenzierung der drei Untereinheiten der oktaedrischen Proteinkristalle erhaltenen Aminosäureabfolgen sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Proteinuntereinheit	Molekulargewicht [kDa]	Aminosäuresequenz
<i>VFphy55</i>	55	T (H) S M D R W S R N K T E L I Q (P) A F F
<i>VFphy46</i>	46,5	I P E I N Y K N V F W ? P ? T S ? T (V) P
<i>VFphy16</i>	16	W V T A S Y V Q P ? V M A ? ? L F L Y D

Tab. 4

Aminosäuresequenzen der drei isolierten Proteine oktaedrischer Kristalle der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus*.

Es wird deutlich, dass die Aminosäuresequenz nicht immer zweifelsfrei festgestellt werden konnte. Ein Fragezeichen symbolisiert eine nicht identifizierte Aminosäure, während eine Klammer darauf hindeutet, dass das Sequenzierungsergebnis mit gewissen Einschränkungen zutrifft.

Da die in der SDS-PAGE bei 55 kDa sichtbare Bande aufgrund ihrer Intensität darauf schliessen ließ, dass diese Untereinheit auch quantitativ am stärksten repräsentiert ist und ihre Aminosäuresequenz am wenigsten fehlerbehaftet erschien, wurde von dieser Aminosäuresequenz zum Zwecke der Suche in einer Gen-Bibliothek von *Phycomyces blakesleeanus* eine Oligonukleotidabfolge abgeleitet. Darüberhinaus erwies sich diese Sequenz auch deshalb als günstig, da das immer als Startcodon dienende Methionin enthalten war.

Methionin	Asparaginsäure	Arginin	Tryptophan	Serin	Arginin	Asparagin	Lysin	Threonin	Glutaminsäure	Leucin	Isoleucin	Glutamin		
M	D	R	W	S	R	N	K	T	E	L	I	Q		
5'-	ATG	GAT	CGN	TGG	WSN	CGN	AAT	AAG	ACN	GAG	TTN	ATT	CAG	-3'

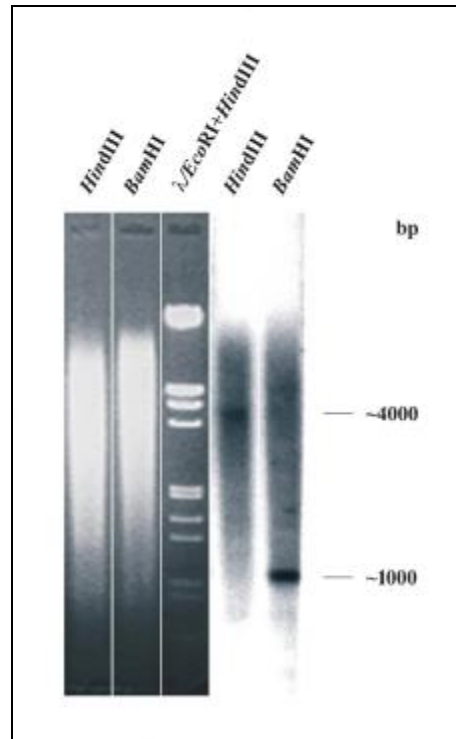
Abb. 91

Sequenz der aus der 55kDa-Proteinuntereinheit abgeleiteten Sonde *VFphy55*.

Ausgehend von der Codon-Zuordnung bei *Phycomyces blakesleeanus* und ihrer Abundanz (www.es.embnet.org/~genus/phycogenes.html) ergab sich die in Abb. 91 dargestellte Nukleotidsequenz. Da Methionin als Startcodon einen Anhaltspunkt bei Sequenzvergleichen bilden kann, wurde es auch als 5'-Ende für das 39-mer-Oligonukleotid gewählt. Überall dort, wo durch das sogenannte Wobbling mehrere Basen in Frage kamen, wurden gemäß den IUB-Regeln Stellvertreter gesetzt.

4.2.3 Hybridisierung von Gesamt-DNA

Zur Abschätzung, ob ein Durchmustern der Gen-Bibliothek von *Phycomyces blakesleeanus* mit dem von der Aminosäuresequenz abgeleiteten Oligonukleotid *VFphy55* Erfolg verspricht, wurde Gesamt-DNA aus Wildtyp *NRRL1555* isoliert, mit *Bam*HI und alternativ *Hind*III restringiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte die Hybridisierung mit dem *VFphy55*. Abb. 92 zeigt sowohl die Gelspuren mit dem Restriktionsmuster, als auch die Hybridisierungssignale. Von links nach rechts: *Hind*III-Restriktionsmuster der Gesamt-DNA, *Bam*HI-Verdaumuster, DNA-Fragmentlängenmarker, Hybridisierungssignal des *Hind*III-Verdaus und Autoradiogramm der *Bam*HI-Restriktion.

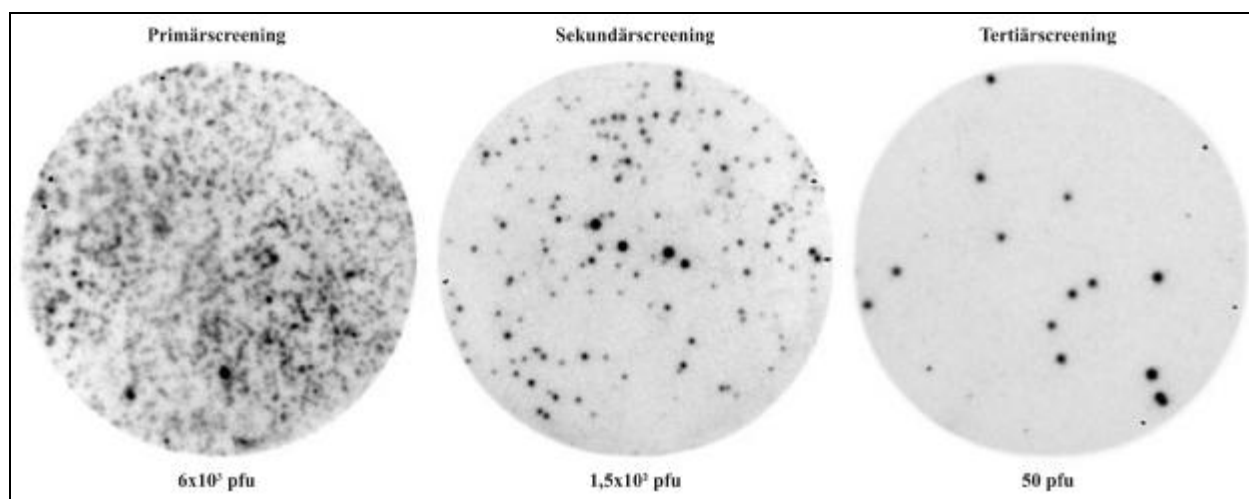
**Abb. 92**

Restriktionsverdau und Autoradiogramm von Gesamt-DNA aus Wildtyp *NRRL1555* von *Phycomyces blakesleeanus*. Hybridisiert mit Sonde *VFphy55*. Von links nach rechts: Restriktionsmuster von *HindIII* und *BamHI*, DNA-Größenmarker, Hybridisierungssignal des *HindIII*- und *BamHI*-Verdaus.

Wegen der unvollständigen Restriktion der Gesamt-DNA ergibt sich im Agarosegel ein Schmier. Die Autoradiografie zeigt nach Hybridisierung mit *VFphy55* im Falle des Verdaus mit *HindIII* vor dem relativ starken Hintergrund ein Signal, das einer Fragmentlänge von etwa 4000 Basenpaaren entspricht. Dagegen tritt eine starke Schwärzung des Röntgenfilms bei 1 kb nach Restriktion mit *BamHI* auf. Aufgrund dieser positiven Resultate konnte nachfolgend das Durchmustern der Genbank von *Phycomyces blakesleeanus* erfolgen.

4.2.4 Screening der genomischen DNA-Bibliothek

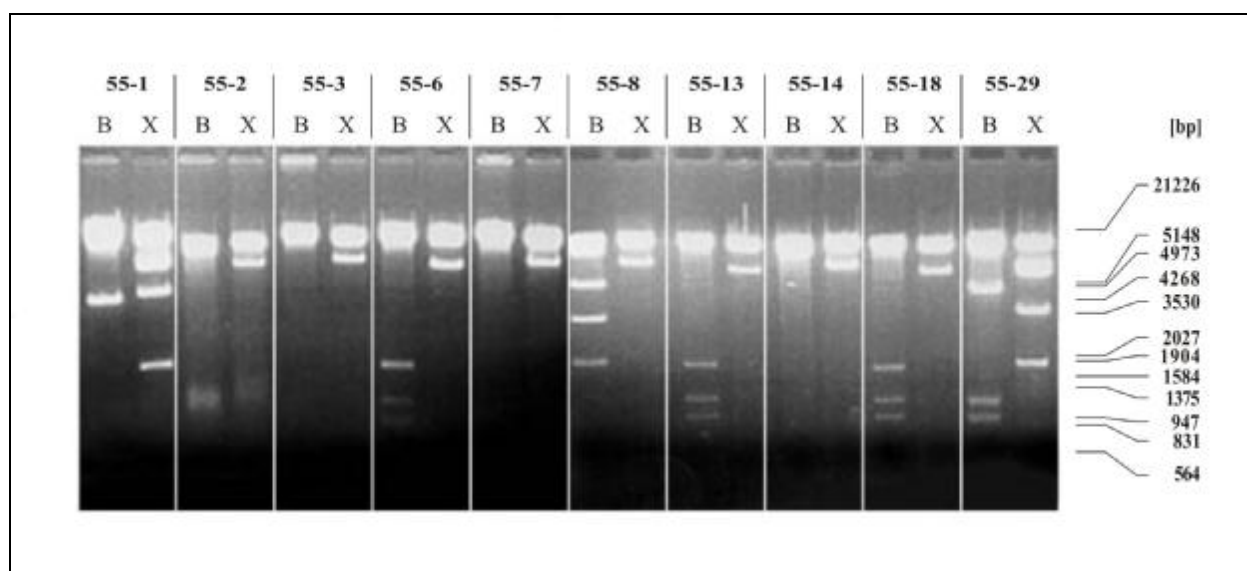
Die genomische Bank des Wildtyps *NRRL1555* von *Phycomyces blakesleeanus* wurde mit der Sonde *VFphy55* hybridisiert. Nach dem Primärscreening von ca. 6×10^4 pfu konnten 32 positive Klone bestimmt werden, wovon 10 starke Signale ausgewählt wurden. Mit Hilfe weiterer zwei Screeningrunden von etwa 150 und 50 pfu/Platte wurden die Klone isoliert. Diese konnten dann mittels Restriktionsanalyse weiter charakterisiert werden. Abb. 93 zeigt repräsentativ die Autoradiogramme aller drei Screeningrunden eines ausgewählten Klons.

**Abb. 93**

Repräsentative Autoradiogramme von Plaquelift-Hybridisierungen aller drei Screeningrunden, hybridisiert mit Sonde *VFphy55*.

4.2.5 Charakterisierung der positiven Klone durch Restriktionsanalyse

Von den aus der Koloniehybridisierung hervorgegangenen positiven Phagenklonen wurden zehn ausgewählt, wie in Abschnitt 3.9.1 beschrieben, durch Flüssiglysate amplifiziert und die genomische DNA von *Phycomyces blakesleeanus* aus dem Bakteriophagen λ GEM11 isoliert.

**Abb. 94**

Restriktionsmuster der Klone enthaltenden λ GEM11-Phagen. Restringiert wurde jeweils mit *Bam*HI(links) und *Xho*I(rechts).

Die Restriktionsverdauere erfolgten zunächst mit *Bam*HI. Daneben wurden die Klone zur Kontrolle an den weiter aussen liegenden *Xho*I-Schnittstellen restringiert, um die Inserts vollständig auszuschneiden. In Abb. 94 ist das Restriktionsmuster der 10 ausgewählten Klone wiedergegeben. In der jeweils linken Gelspur befindet sich der *Bam*HI-Verdau, während daneben der Restriktionsverdau mit *Xho*I aufgetragen wurde. Aus dem Restriktionsverdau ergaben sich sechs Restriktionsmuster mit der in Tab. 5 angeführten Verteilung der Klone.

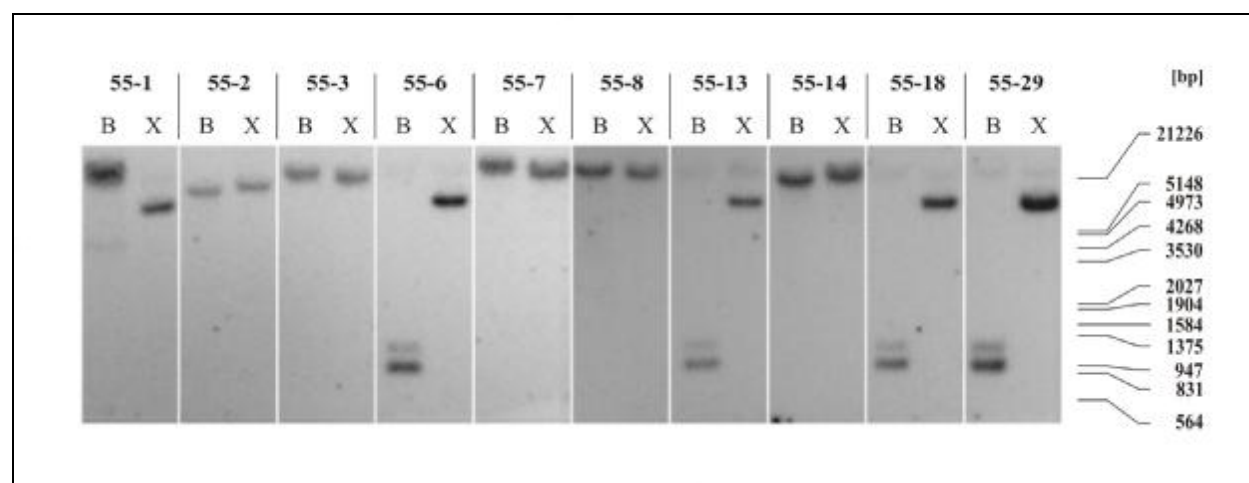
Restriktionsmuster	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Klon	55-1	55-2	55-3	55-6	55-8	55-29
			55-7	55-13		
			55-14	55-18		

Tab. 5

Verteilung der Restriktionsmuster auf die zehn Klone aus dem Bakteriophagenverdau.

4.2.6 Hybridisierung der restringierten Klone mit degeneriertem Oligo

Um zu überprüfen, welche Fragmente aus dem Restriktionsverdau der zehn Klone ein Hybridisierungssignal zeigen und weiter kloniert werden können, wurde die restringierte DNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit dem degenerierten Oligo *VFphy55* hybridisiert. In Abb. 95 ist das zum Restriktionsmuster der Abb. 94 korrespondierende Autoradiogramm des Hybridisierungsexperimentes dargestellt.

**Abb. 95**

Autoradiogramm des Restriktionsmusters der Klone enthaltenden λ GEM11-Phagen. Restringiert wurde jeweils mit *Bam*HI(links) und *Xho*I(rechts), hybridisiert mit der Sonde *VFphy55*.

Abweichend von der Verteilung der Restriktionsmuster zeigen die Klone 55-6, -13, -18 und -29 die gleiche Verteilung der Autoradiografiesignale. Während 55-29 im Restriktionsmuster von den anderen drei Klonen abweicht, ergibt sich nach Hybridisierung eine Übereinstimmung des Signalmusters. Alle vier Klone zeigen das bereits beim Verdau der Gesamt-DNA beobachtete starke Signal bei etwa 1 kb im *Bam*HI-Verdau und ein deutliches Signal bei ungefähr 9 kb nach Restriktion mit *Xho*I.

4.2.7 Kartierung der sequenzierten *VFphy55*-Region

Nach der Isolierung und Sequenzierung des 1 kb-Fragmentes ergab sich die in Abb. 96 dargestellte Orientierung der Sonde *VFphy55*. Der zur Sonde homologe Sequenzabschnitt ist 124 Nukleotide stromaufwärts vom 3'-Ende lokalisiert, wie in der Abbildung gezeigt. Es ergibt sich jedoch keine vollständige Sequenzidentität. Die durch die Sterne gekennzeichnete Identität zwischen degenerierter Sonde und Zielsequenz beträgt 69,2 %.

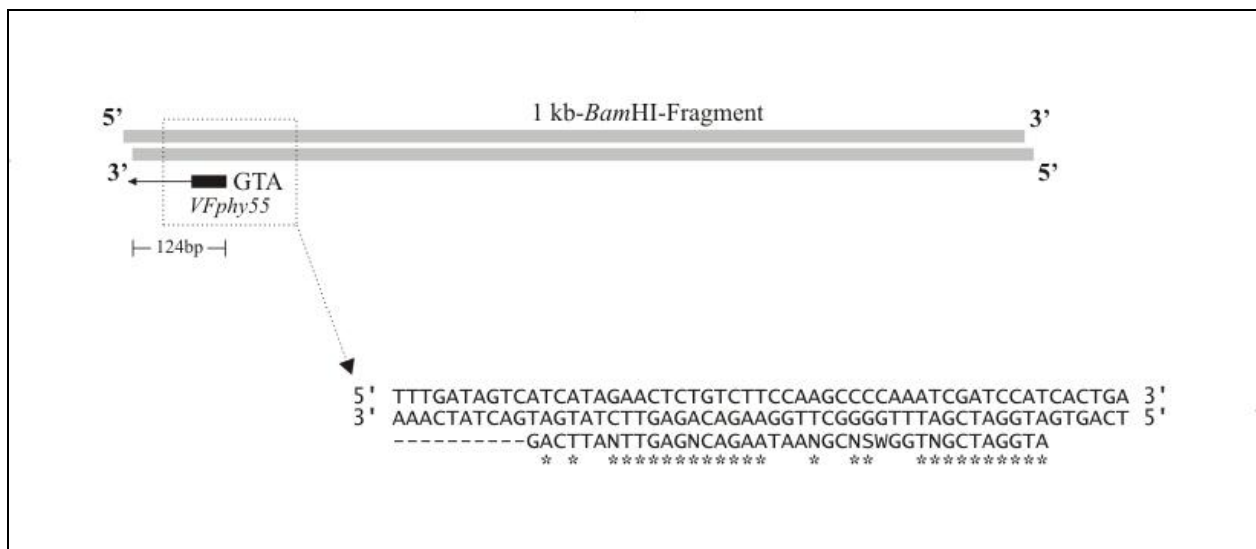


Abb. 96

Sequenzpaarung und Position der degenerierten Oligonukleotidsonde *VFphy55* im 1kb-*Bam*HI-Fragment des Klons 55-18 aus genomischer DNA aus *Phycomoyces blakesleeanus* Wildtyp NRRL1555.

Ausgehend von einem Gesamt-Molekulargewicht von 55 kDa der Untereinheit *VFphy55* der oktaedrischen Proteinkristalle und einem durchschnittlichen Molekulargewicht einer Aminosäure von 0,11 kDa resultiert eine codierende DNA-Sequenz von etwa 1500 Basenpaaren. Da das bereits subklonierte Fragment nur eine Länge von 1000 Basenpaaren aufweist und es sich um genomische DNA mit Intronsequenzen handelt, waren daher zusätzliche Sequenzinformationen

zur Überprüfung der Orientierung des 1 kb-Fragmentes im Genom und zur weiteren Aufklärung der Umgebung der Sonde notwendig. Aufgrund der gleichen Restriktionsmuster der Klone 55-6, -13, -18 und -29 und der Sequenzidentität aller vier 1kb-Fragmente erfolgte die weitere Untersuchung mit Klon 55-18. Dieser wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt. In Abb. 97 sind neben den Einzelverdauen auch die Restriktionsmuster aus unterschiedlichen Kombinationen jeweils zweier Restriktionsenzyme dargestellt. Aus der Verteilung und der Fragmentlänge der einzelnen DNA-Abschnitte in Abb. 97 und den Sequenzinformationen war es möglich, über die Lage der Restriktionsschnittstellen die in Abb. 98 wiedergegebene Karte der für *VFphy55* codierenden Region zu erstellen. Der gesamte sequenzierte Bereich, der die codierende Region für *VFphy55* trägt, umfasst 5185 Nukleotide (Gesamtsequenz im Anhang). Die Zielsequenz für die Oligonukleotidsonde befindet sich zwischen den Basen 1940 und 1979.

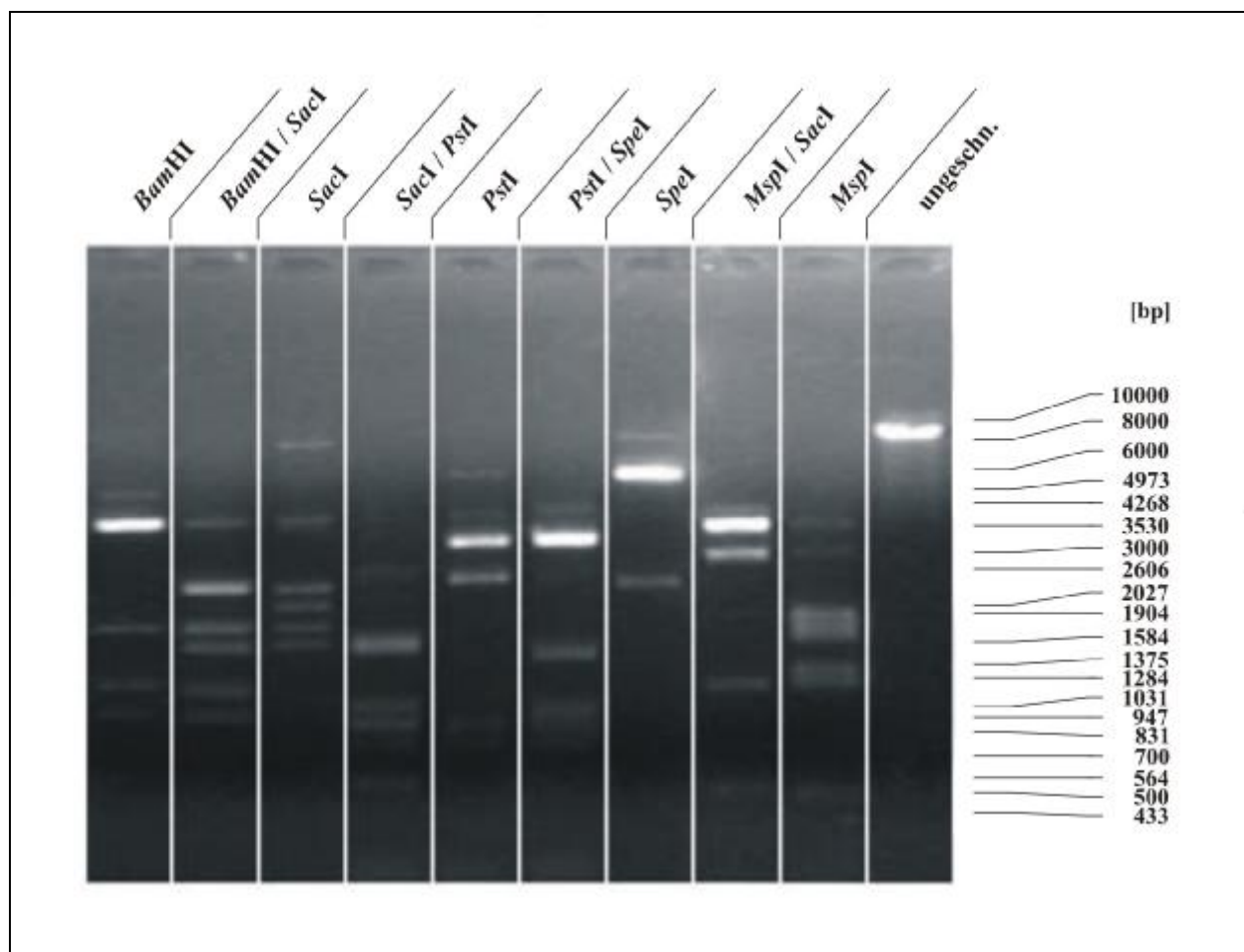
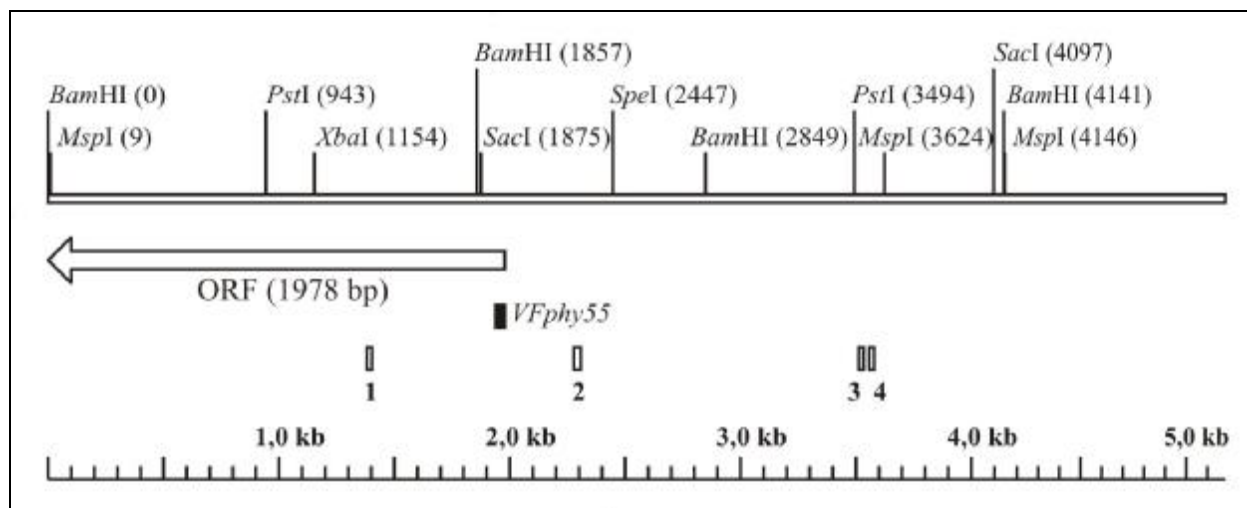


Abb. 97

Einzel- und Doppelverdau des Klons 55-18. Aufgetragen sind von links nach rechts alternierend die Restriktionsmuster des einzelnen Enzyms und das Verdauemuster der Kombination zweier Enzyme. Die letzte Spur rechts zeigt das ungeschnittene Gesamtfragment.

**Abb. 98**

Kartierung des klonierten Abschnitts. Der Pfeil markiert die für die 55 kDa-Untereinheit codierende Region (ORF). 1-4 kennzeichnet die Lage der identischen Bereiche aus den Sequenzvergleichen. *VFphy55* markiert die Position der Zielsequenz der degenerierten Oligonukleotidsonde. Im oberen Teil ist die Lage der Schnittstellen aus den Verdauemustern aus Abb. 97 wiedergegeben.

4.2.8 Sequenzvergleiche

Mit dem Strang, der die zur Sonde *VFphy55* homologe Basenabfolge enthält, wurden computergestützte globale Sequenzvergleiche durchgeführt, um weitere Informationen über Sequenzähnlichkeiten mit anderen Organismen zu erhalten. Aufgrund der Daten über die Assoziation flavin- und pterinartiger Pigmente mit den oktaedrischen Kristallen aus *Phycomyces blakesleeanus* sollten diese Informationen zur Aufklärung der Natur und Funktion dieser Assoziation dienen. Die aus den Untersuchungen zur kristallmodulierten Calciumabhängigkeit des Längenwachstums und der gravitropen Beugung der Sporangiothoren erhaltenen Hinweise dienten darüberhinaus ebenfalls als Grundlage für Sequenzvergleiche.

Die Recherche ergab Sequenzidentitäten zu Biomolekülen, die in der Signaltransduktion bedeutende Rollen einnehmen. So konnten Übereinstimmungen mit einem Calcium bindenden Protein aus *Rattus norvegicus* gefunden werden. Weiter fanden sich Ähnlichkeiten zu einer vakuolären ATPase aus *Mus musculus* und darüberhinaus Hinweise auf cGMP gesteuerte Kanäle in der Phototransduktion bei *Bos taurus*. Übereinstimmungen zu Pterin- oder Flavinbindedomänen konnten dagegen nicht gefunden werden.

1)

Oktaedrische Proteinkristalle:
Bos taurus cyclic nucleotide gated
 channel alpha 1 (CNGA1), mRNA :
 (gi31342442)

```

1382 GAAAAGAAAAAGAAGAAAGAA 1402
      |||||
564  GAAAAGAAAAAGAAGAAAGAA 584
  
```

2)

Oktaedrische Proteinkristalle:***Rattus norvegicus* calcium-binding
protein mRNA, complete cds:
(gi1186870)**

2278 AGGAAGATGATGAAGATGAAGACGACTTGG 2307
 ||||| ||||| |||||
 422 AGGAAGATGAAGAAGATGAAGATGACTTGG 451

3)

Oktaedrische Proteinkristalle:***Cladosporium fulvum* gamma-aminobutyric acid
transaminase (gat1) gene, complete cds:
(gi10443978)**

3512 TTGAAGGAGAGGATGGACATG 3532
 ||||| ||||| |||||
 623 TTGAAGGAGAGGATGGACATG 603

4)

Oktaedrische Proteinkristalle:***Mus musculus* ATPase, H⁺ transporting,
V0 subunit D, isoform 2 (Atp6v0d2), mRNA:
(gi29150254)**

3558 TAAGGTGGTTGAGAAGGTGT 3577
 ||||| ||||| |||||
 2357 TAAGGTGGTTGAGAAGGTGT 2338

4.2.9 Northernblotanalyse

Mit Hilfe von Northernblotanalysen sollte untersucht werden, ob das Vorhandensein der oktaedrischen Kristalle von *Phycomyces blakesleeanus* in Zusammenhang mit den Wachstumsbedingungen der Sporangiothoren steht. Es sollte näher beleuchtet werden, ob das Entstehen der Kristalle durch verschiedenen Lichtbedingungen während der Anzucht beeinflusst wird. Darüberhinaus dienten die Northernblotanalysen dazu, der Frage nachzugehen, auf welcher Stufe die Biosynthese der oktaedrischen Kristalle durch Mutation unterbrochen worden sein kann. Dies kann Aufschluss darüber geben, ob in den phänotypisch kristallfreien Stämmen noch Proteinvorstufen der oktaedrischen Kristalle vorhanden sind. Die Untersuchungen sollten Hinweise darauf ergeben, ob die Expression der für die oktaedrischen Proteinkristalle codierenden Gene erst im Sporangiothorenstadium stattfindet, oder bereits im Entwicklungsstadium des Myzels erfolgt. Daher wurden parallel zu den Stadium I-Sporangiothoren auch Myzelien der beiden Stämme *MR74* und *MR 77* untersucht. Beide Mutanten unterscheiden sich nur durch das Vorhandensein der oktaedrischen Proteinkristalle.

5'- TAC CTA GCT AAA CCC CGA ACC TTC TGT CTC AAG ATA CTA -3'

Abb. 99

Von der Zielsequenz aus Southernhybridisierung abgeleitete Sonde *VFphy55r* für Northernblots.

Abb. 100 stellt die Autoradiogramme der Expressionsstudien mit der Sonde *VFphy55r* (Abb. 99) an SI-Sporangiophoren und Myzel der beiden Stämme *MR74* und *MR 77* dar. In der linken Hälfte sind die Resultate für die kristalllose Mutante *MR74* gezeigt, rechts für *MR77*. Jeweils links befinden sich die Autoradiogramme der Sporangiophoren, daneben die des Myzels. Die Bestrahlungsbedingungen während des Wachstums sind durch Farbmarkierungen über den einzelnen Spuren der Northernblots kenntlich gemacht. Neben Blaulicht und roter Bestrahlung kennzeichnet die schwarze Markierung die jeweilige Dunkelkontrolle. Der obere Bereich spiegelt die Autoradiografieergebnisse nach Hybridisierung mit der dgenerierten Sonde *VFphy55r* wieder, während im unteren Teil die Röntgenfilmschwärzungen nach Hybridisierung mit der *pyrG*-cDNA für die Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase (DIAZ-MINGUEZ et al., 1990 und BLASCO et al., 2001) als Kontrolle dargestellt sind.

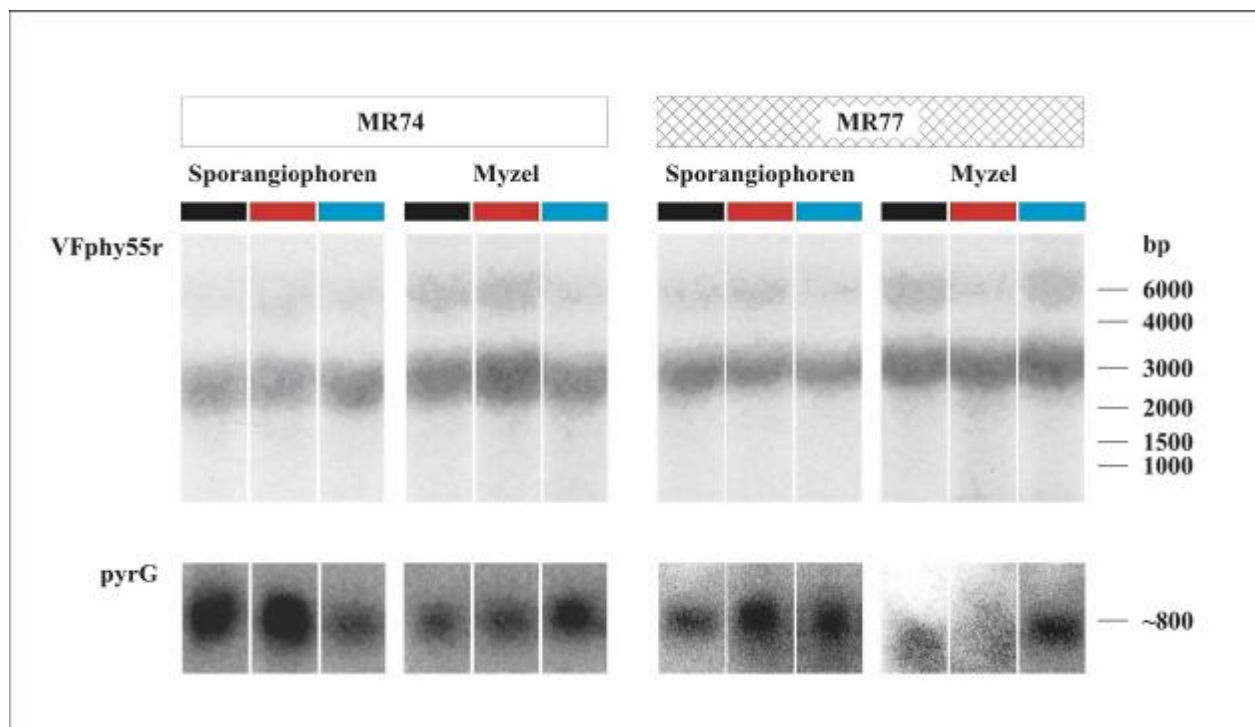


Abb. 100

Autoradiogramme der Northernblots von Gesamt-RNA aus Myzel und SI-Sporangiophoren (ohne und mit Kristallen) nach Anzucht unter verschiedenen Lichtbedingungen (Rotlicht ■, Blaulicht ■, Dunkelkontrolle ■). Hybridisiert mit Sonde *VFphy55r*; Kontrollen mit Sonde *pyrG*.

Die Kontrollen zeigen mit variierender Intensität eine deutliche Schwärzung entsprechend einer Fragmentgröße von etwa 800 Basenpaaren. Die Autoradiogramme der *VFphy55r*-Hybridisierungen ergeben insgesamt schwächere Signale. Sowohl für die Sporangiophoren als auch für die Myzelien beider Mutanten erscheinen relativ starke Signale bei etwa 3000 kB und schwache Röntgenfilmschwärzungen, die einer Größe von ungefähr 6000 Basenpaaren entsprechen. Diese Signale entsprechen der rRNA und sind unabhängig von Myzel und

Sporangiophoren einerseits, wie auch den Bestrahlungsvarianten andererseits gleich. Anhand dieser Daten ist keine von der Lichtqualität während des Myzel- oder Sporangioophorenwachstum abhängige Expression der für die Kristallproteine codierenden DNA zu erkennen.

4.3 Photogravitropische Experimente

In unterschiedlichen physiologischen Experimenten sollte untersucht werden, ob und wie die oktaedrischen Kristalle von *Phycomyces blakesleeana* das Beugungsverhalten der Sporangioophoren unter verschiedenen äußeren Bedingungen beeinflussen. Diese Experimente wurden parallel mit den vier Stämmen *MR14*, *MR18*, *MR74* und *MR77* durchgeführt, von denen Isogenität angenommen wurde. Während *MR14* und *MR18* im Gegensatz zu *MR74* und *MR77* kein Carotin besitzen, zeichnen sich *MR14* und *MR77* durch das Vorhandensein von oktaedrischen Kristallen aus. *MR18* und *MR74* fehlen dagegen diese Kristalle.

4.3.1 Einfluss tonischer Bestrahlung auf die Kristallwirkung im Gravitropismus

Untersuchungen zum tonischen Effekt von phototropisch inaktivem roten Licht von 612 nm bei Wildtyp *NRRL1555* und der kristalllosen Mutante *C2* zeigten eine stimulierende Wirkung bei beiden Stämmen. Dabei ergab sich bei niedrigen Intensitäten von 10^{-8} W/m^2 im Vergleich zu den Dunkelkontrollen beim Wildtyp ein hemmender Effekt, während oberhalb dieser Intensitäten die Sporangioophorenbeugung gefördert wurde. Die kristalllose Mutante *C2* erfuhr bei 10^{-8} W/m^2 eine stärkere Stimulation, wogegen bei Intensitäten von $0,5 \text{ W/m}^2$ der Effekt umgekehrt wurde und eine Beugungshemmung eintrat (TRÖSTER, 2000).

Da es sich bei der Mutante *C2* und dem Wildtyp *NRRL1555* nicht um isogene Stämme handelt, sollte obiger Befund mit den Stämmen *MR14*, *MR18*, *MR74* und *MR77*, die als isogen erachtet wurden, besonders im Randbereich des Rotlicht-Intensitätsspektrums überprüft werden. Die Bestrahlung erfolgte daher mit 10^{-8} W/m^2 und $0,5 \text{ W/m}^2$ jeweils über 4 Stunden.

4.3.1.1 Bestrahlung mit $0,5 \text{ W/m}^2$

Abb. 101 gibt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe mit der tonischen Bestrahlung von $0,5 \text{ W/m}^2$ wieder. Bei dem Vergleich der vier Stämme ergibt sich für die Mutanten mit oktaedrischen

Kristallen eine größere Stimulanz der gravitropischen Beugung unter dem Einfluss einer tonischen Rotlichtbestrahlung mit $0,5 \text{ W/m}^2$ als bei den kristalllosen Mutanten. Dies gilt sowohl für die carotinhaltigen Stämme als auch für die Albino-Mutanten untereinander. Darüberhinaus scheint Carotin einen fördernden Effekt auf die Beugung auszuüben, wenn man nur die kristalllosen Mutanten vergleicht. Der stimulierenden Effekt der Kristalle ist offenbar bei den Albino-Stämmen größer als bei den carotinhaltigen Mutanten. Carotin scheint dort einen hemmenden Effekt auf die Wirkung der Kristalle zu besitzen. Die stimulierende Wirkung der Kristalle auf die gravitropische Beugung wird auch bei den Dunkelkontrollen deutlich, wogegen Carotin darauf keinen Einfluss zu haben scheint.

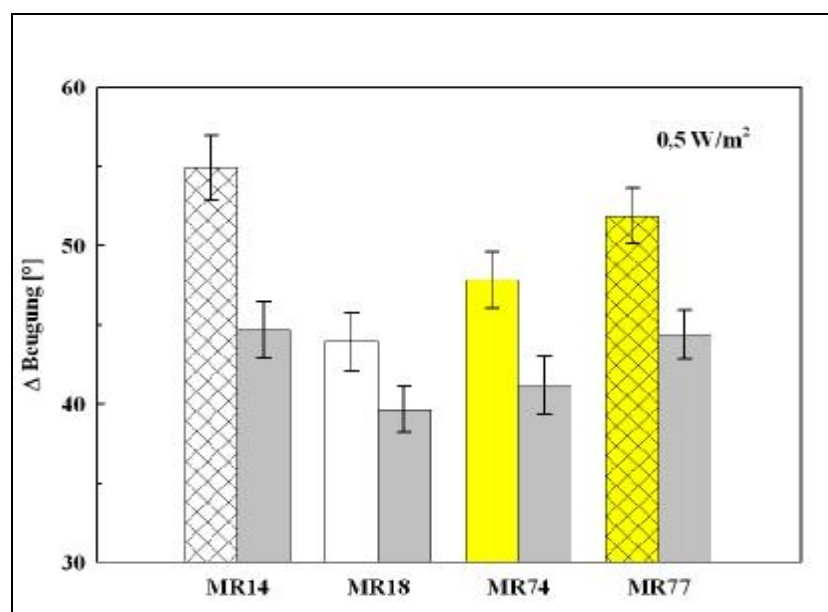
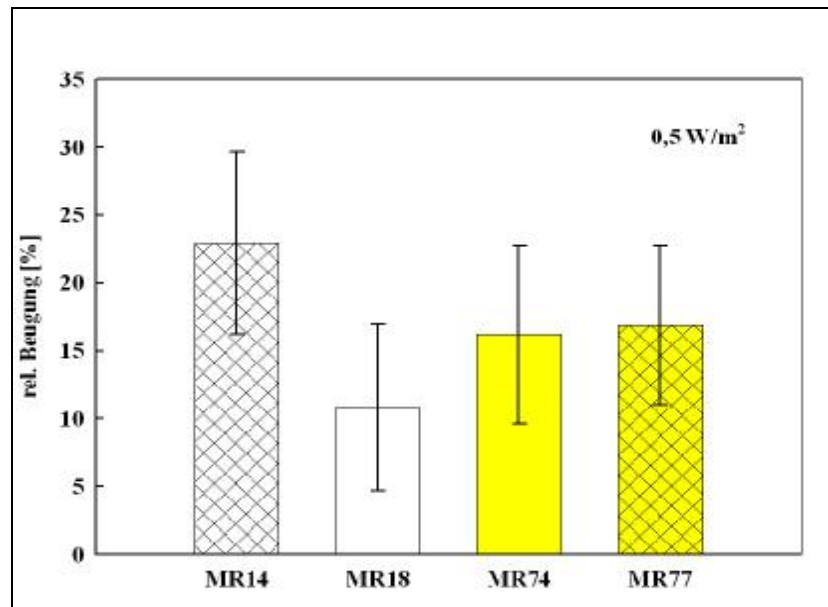


Abb. 101

Beugungswinkel der vier Stämme *MR14*, *MR18*, *MR74* und *MR77* (■ mit Carotin, ▨ mit Kristallen, ■ Dunkelkontrollen, jede Säule repräsentiert 120 Einzelwerte) nach vierstündiger tonischer Bestrahlung mit Rotlicht (612 nm, $0,5 \text{ W/m}^2$).

In Abb. 102 ist zur Verdeutlichung nochmals die relative Beugung bezogen auf die jeweiligen Dunkelkontrollen dargestellt.

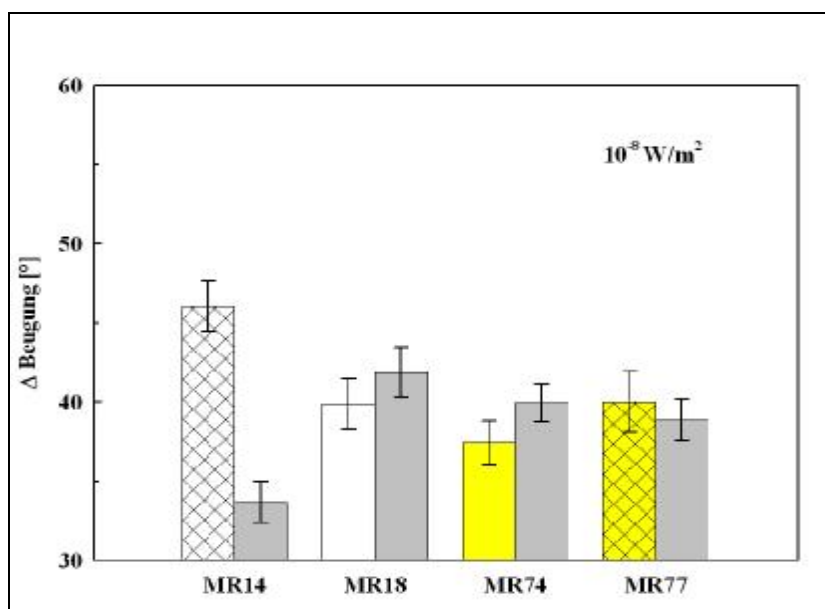
Die carotinfreie Kristall-Mutante *MR14* erfährt eine Beugungssteigerung um etwa 25% der Dunkelkontrolle. Die drei übrigen Stämme werden gegenüber ihren Kontrollen ebenso in der gravitropischen Beugung stimuliert, etwa um den Faktor 10 – 15%. Die Carotin-Stämme *MR74* und *MR77* verhalten sich gleich. Bei diesem Paar ist kein durch oktaedrische Kristalle verändertes Beugungsverhalten erkennbar.

**Abb. 102**

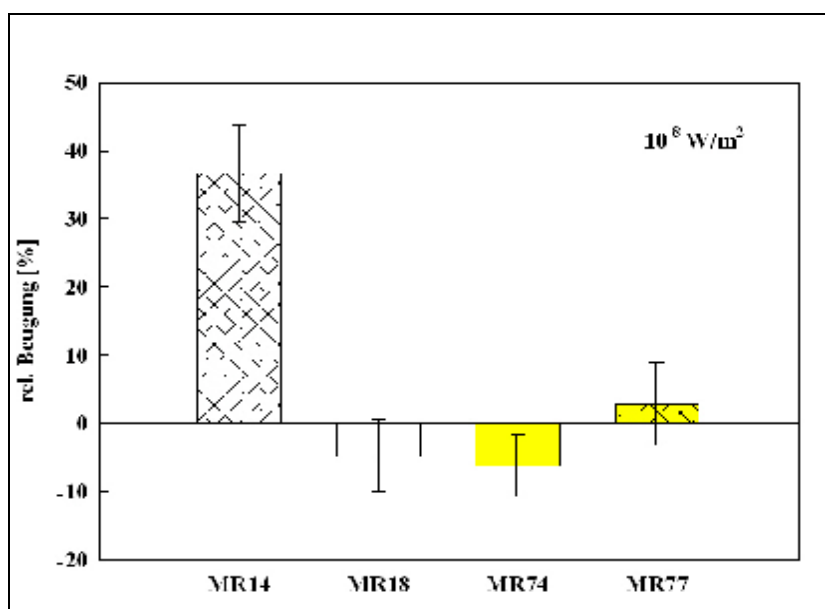
Relative Beugung der vier Stämme *MR14*, *MR18*, *MR74* und *MR77* bezogen auf die Beugung der Dunkelkontrollen (■ mit Carotin, ▤ mit Kristallen) nach vierstündiger tonischer Bestrahlung mit Rotlicht (612 nm, 0,5 W/m²).

4.3.1.2 Bestrahlung mit 10^{-8} W/m²

Die Ergebnisse der Beugungsversuche mit tonischer Rotlichtbestrahlung von 10^{-8} W/m² sind in Abb. 103 dargestellt. Bei einer tonischen Bestrahlung mit 10^{-8} W/m² Rotlicht zeigen die Stämme mit Kristallen eine stärkere Beugung als die entsprechenden kristalllosen Mutanten *MR18* und *MR74*. Dies gilt für die Albino-Mutanten und ebenso für die Stämme mit Carotin. Carotin scheint auch unter diesen Bedingungen einen hemmenden Effekt auf die Sporangiphorenbeugung zu besitzen. Der Unterschied zwischen dem Stamm mit Kristallen und dem kristalllosen Stamm ist bei den carotinhaltigen Mutanten nicht so groß, wie bei den carotinfreien Stämmen. Im Gegensatz zu der Versuchsreihe mit 0,5 W/m² erfolgt im Falle der kristalllosen Mutanten eine Hemmung der Beugung durch Carotin. Insgesamt sind die Beugungswinkel kleiner als bei der höheren Rotlichtintensität. Bei 10^{-8} W/m² zeigt allerdings nur *MR14* eine deutliche Steigerung der gravitropischen Beugung, gemessen an der Dunkelkontrolle um etwa 35 – 40% (Abb. 104). Die kristalllosen Stämme erfahren gegenüber ihren Dunkelkontrollen sogar eine geringfügige Hemmung der Beugung. Im Falle von *MR77* ist die Stimulierung der gravitropen Beugungsreaktion zu vernachlässigen. Bemerkenswert ist die geringe gravitrope Beugung der Kontrollen von *MR14*, verglichen mit den Kontrollen der anderen Stämme.

**Abb. 103**

Beugungswinkel der vier Stämme *MR14*, *MR18*, *MR74* und *MR77* (■ mit Carotin, ▨ mit Kristallen, ■ Dunkelkontrollen, jede Säule repräsentiert 120 Einzelwerte) nach vierstündiger tonischer Bestrahlung mit Rotlicht (612 nm, 10^{-8} W/m²).

**Abb. 104**

Relative Beugung der vier Stämme *MR14*, *MR18*, *MR74* und *MR77* bezogen auf die Beugung der Dunkelkontrollen (■ mit Carotin, ▨ mit Kristallen) nach vierstündiger tonischer Bestrahlung mit Rotlicht (612 nm, 10^{-8} W/m²).

4.3.2 Gravitropische Beugung

Die Untersuchung des Einflusses oktaedrischer Kristalle auf die gravitropische Beugung der Sporangiphoren wurde mit Hilfe der Klinostazentrifuge durchgeführt. Die Versuchsdauer wurde auf drei Stunden begrenzt, um Sättigungseffekte in der Beugungsreaktion auszuschliessen. Nach MEIER (2001) zeigen die kristalltragenden Mutanten *MR14* und *MR74* jeweils eine stärkere gravitrope Beugung als ihre kristallfreien Pendanten *MR18* und *MR77* nach Stimulierung mit Zentrifugalbeschleunigungen von 0 bis 0,3 x g. Der Unterschied trat allerdings erst bei 0,3 x g deutlich in Erscheinung. Daher wurden die vier Stämme *MR14*, *MR18*, *MR74* und *MR77* während der Versuchsreihe Zentrifugalbeschleunigungen von 0,33 x g bis zu 1 x g ausgesetzt. Aus der Zentrifugalbeschleunigung und der gleichzeitig wirkenden Erdbeschleunigung resultieren auf die Sporangiphoren Beschleunigungen zwischen 1,05 und 1,41 x g. In der folgenden Abb. 105 sind die Mittelwerte von jeweils 100 Einzelresultaten dargestellt.

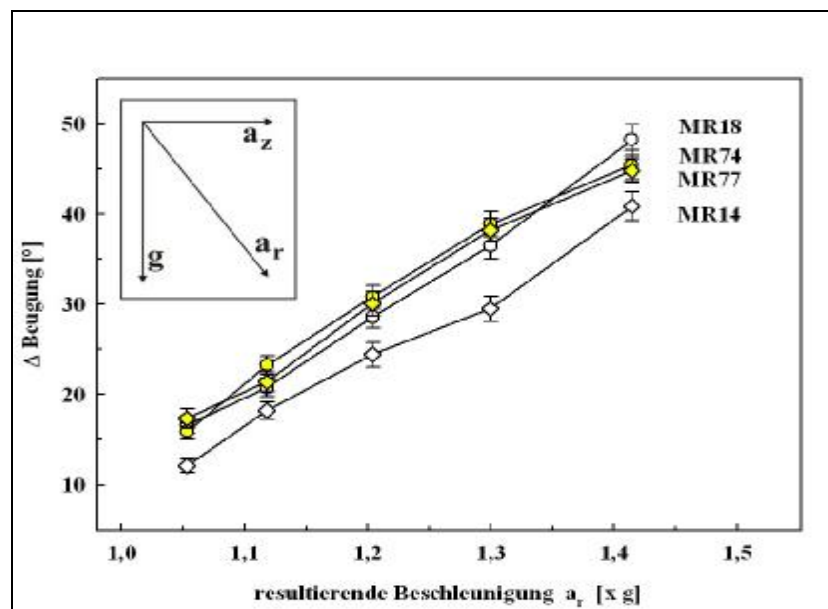


Abb. 105

Beugungswinkel der vier Stämme *MR14*◇, *MR18*○, *MR74*● und *MR77*◆ (■ mit Carotin, ◇ mit Kristallen) in Abhängigkeit von der aus Zentrifugal (a_z)- und Erdbeschleunigung (g) resultierenden Beschleunigung a_r nach dreistündiger Versuchsdauer (jedes Symbol repräsentiert 100 Einzelwerte).

Die gravitropische Beugung aller vier Stämme nimmt mit der resultierenden Beschleunigung zu. Die carotinfreie Kristall-Mutante *MR14* zeigt dabei die schwächste Reaktion. Dagegen unterscheiden sich die übrigen drei Stämme in ihren Beugungsverhalten kaum voneinander. Unterhalb von 1,3 x g scheinen die Carotin-Mutanten etwas stärker auf die gravitrope

Stimulierung zu reagieren, während sich die Sporangioophoren der carotin- und kristallfreien Mutante *MR18* bei $1,41 \times g$ am stärksten beugen. Nach Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung von $1,3 \times g$ auf $1,41 \times g$ zeigen die carotinfreien Mutanten *MR14* und *MR18* eine größere Zunahme des Beugungswinkels. Bei den beiden Carotin-Mutanten *MR74* und *MR77* ist die Steigerung der gravitropischen Reaktion dagegen abgeschwächt.

4.3.3 Längenwachstum

Neben dem gravitropischen Beugungsverhalten soll das Längenwachstum der vier Stämme *MR14*, *MR18*, *MR74* und *MR77* vor dem Hintergrund eines Einflusses der oktaedrischen Kristalle betrachtet werden. Die Sporangioophoren wurden dazu drei Stunden im Dunkeln in Luft inkubiert.

Sowohl beim absoluten Längenzuwachs in Abb. 106 als auch beim auf die Ausgangslänge der Sporangioophoren bezogenen relativen Längenwachstum (Abb. 107) wird deutlich, dass die Sporangioophoren der carotinfreien kristallbesitzenden Mutante *MR14* nach der dreistündigen Versuchsdauer das stärkste Längenwachstum zeigt. Die anderen drei Stämme *MR18*, *MR74* und *MR77* verhalten sich untereinander gleich.

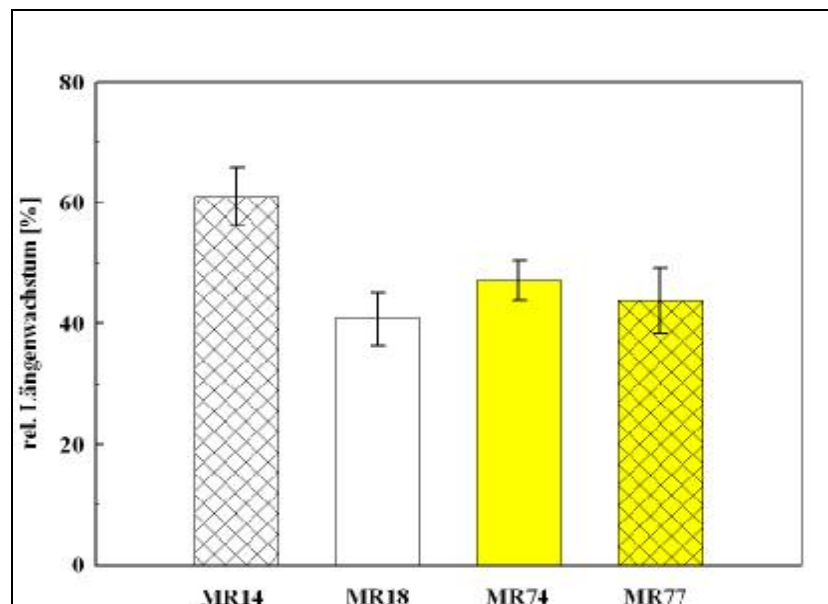


Abb. 106

Relatives Längenwachstum der vier Stämme *MR14*◇ *MR18*○, *MR74*● und *MR77*◆ (■ mit Carotin, ◇ mit Kristallen) während dreistündiger Versuchsdauer.

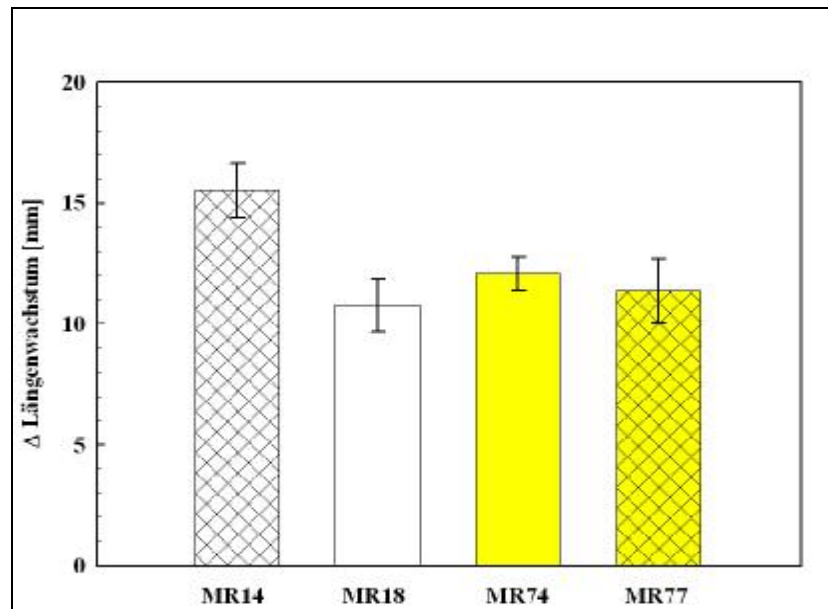


Abb. 107

Absolute Längenzunahme der vier Stämme *MR14*◇ *MR18*○, *MR74*● und *MR77*◆ (■ mit Carotin, ◇ mit Kristallen) während dreistündiger Versuchsdauer.

4.3.4 Calcium-Versuche

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse von Versuchsreihen dargestellt, die der Frage nachgehen, wie sich das Vorhandensein oktaedrischer Kristalle bei *Phycomyces blakesleeana* auf das Längenwachstum oder das gravitrope Beugungsverhalten der Sporangioophoren in Abhängigkeit von extern appliziertem Calcium auswirkt. Zu diesem Zweck wurden parallel die Stämmen *MR74* und *MR77* untersucht. *MR74* unterscheidet sich von *MR77* durch das Fehlen der oktaedrischen Kristalle.

4.3.4.1 Längenwachstum

Ob die oktaedrischen Proteinkristalle ein durch Überangebot oder Mangel an Calcium verändertes Längenwachstum beeinflussen, soll anhand der im Folgenden gezeigten Resultate näher beleuchtet werden.

4.3.4.1.1 Calcium-Überangebot

Die Längenzunahme in Millimetern in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration im umgebenden Medium zeigt Abb. 108. Die Werte für das Längenwachstum der Kontrollen wurden von den Werten für die Längenzunahme mit Calcium abgezogen. Daraus resultiert eine Positiv-/Negativdarstellung, aus der sich eine Hemmung oder eine Förderung des Längenwachstums ablesen lässt.

Über einen Calcium-Konzentrationsbereich von etwa $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ – 10^{-3} M zeigt *MR77* im direkten Vergleich der beiden Stämme eine größere Längenzunahme als *MR74*. Während bei *MR77* besonders bei Calcium-Konzentrationen zwischen $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ und 10^{-6} M eine Stimulation des Längenwachstums eintritt, erfolgt bei *MR74* keine signifikante Wachstumszunahme gegenüber den Kontrollen. Das Wachstum scheint vielmehr gehemmt zu werden. Dies besonders für Calcium-Konzentrationen von mehr als 10^{-6} M . *MR77* zeigt in diesem Bereich im Vergleich zu den Kontrollen ein indifferentes Verhalten. Weder wird das Wachstum stimuliert noch findet eine Hemmung statt. Insgesamt führt die externe Zugabe von Calcium bei der kristallfreien Mutante *MR74* zur Wachstumsverminderung, wogegen das Längenwachstum bei *MR77* nahezu nicht verringert wird.

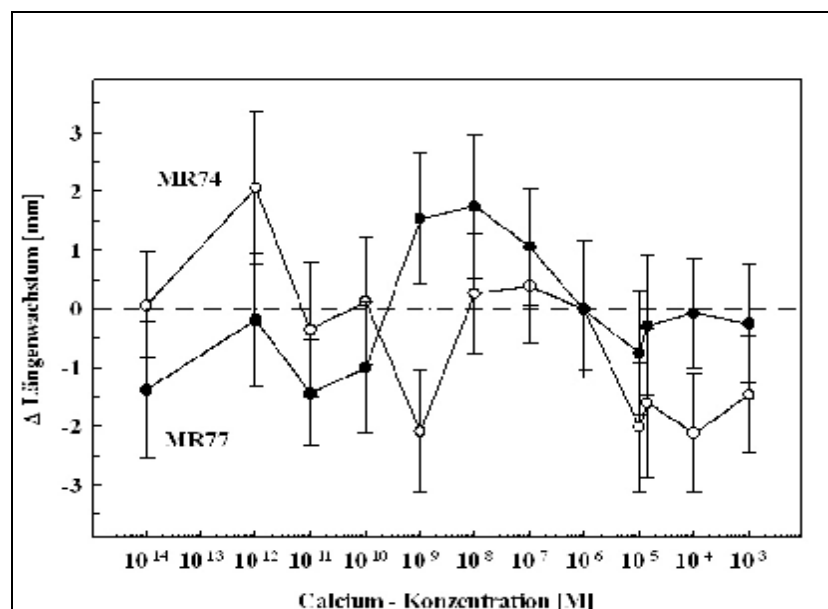


Abb. 108

Abhängigkeit der absoluten Längenzunahme der Stämme *MR74*○ und *MR77*● von der Ca^{2+} -Konzentration im Inkubationsmedium. Die Werte für das Längenwachstum der Kontrollen wurde von den Werten für die Längenzunahme mit Calcium abgezogen. Daraus resultiert eine positiv/negativ-Bilanz.

Es findet sogar unterhalb 10^{-6}M Ca^{2+} eine Stimulation statt. Bei Calcium-Konzentrationen unterhalb $2 \times 10^{-10}\text{M}$ erfährt *MR77* eine stärkere Wachstumshemmung gegenüber den Kontrollen als *MR74*.

Insgesamt ist der Verlauf der Wachstumskurve bei *MR77* weniger mit Ausreißern durchsetzt als dies bei *MR74* der Fall ist. Während die Darstellung der absoluten Längenzunahme in Abb. 108 das Wachstumsverhalten der Sporangiphoren nicht berücksichtigt, stellt die folgende Abb. 109 die Längenzunahme der SIV-Sporangiphoren bezogen auf ihre Ausgangslänge in Abhängigkeit von der Konzentration extern applizierten Calciums dar. Dies führt zu einer Korrektur unterschiedlich starken Längenwachstums der Sporangiphoren und gestattet eine größere Vergleichbarkeit. Die positiven und negativen Prozentangaben beziehen sich auf die Kontrollen, die gleich Null gesetzt wurden, wodurch sich eine deutlichere Illustration von hemmendem oder stimulierendem Effekt ergibt.

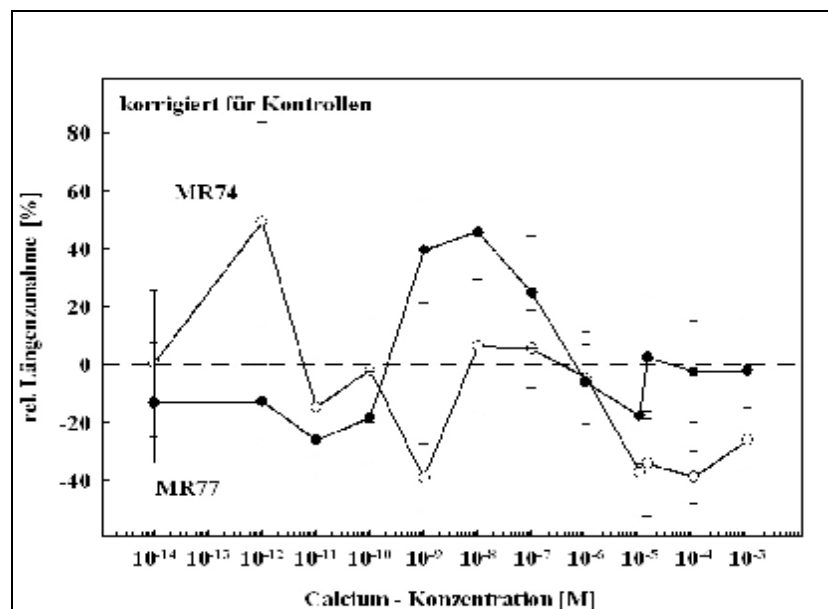


Abb. 109

Abhängigkeit der relativen Längenzunahme der Stämme *MR74*○ und *MR77*● von der Ca^{2+} -Konzentration im Inkubationsmedium. Das Längenwachstum wurde für die Kontrollen korrigiert und in Relation zur Ausgangslänge der Sporangiphoren gesetzt.

Der Vergleich der Abb. 108 u. 109 macht deutlich, dass auch bei Betrachtung des relativen Längenwachstums der Sporangiphoren zwischen $2 \times 10^{-10}\text{M}$ und 10^{-6}M freien Calciums im Inkubationsmedium *MR77* eine deutliche Stimulierung des Sporangiphorenwachstums erfährt, während *MR74* eher gehemmt wird. In diesem Bereich scheint sich bei *MR77* ein Optimum der Förderung des Längenwachstums zu befinden. Bei *MR74* dagegen ist kein derartiger Optimumsbereich zu erkennen. Insgesamt wird *MR77* offenbar stärker im Längenwachstum stimuliert als *MR74*. Bei sehr geringen Calcium-Konzentrationen unterhalb von 10^{-10}M scheint

sich dieses Verhältnis umzukehren. Hier findet eher eine Hemmung des Sporangiphorenwachstums von *MR77* statt, während *MR74* deutlich stimuliert wird. Der Vergleich der beiden Stämme zeigt, dass *MR77* homogener und weniger schwankend auf die unterschiedlichen Calcium-Konzentrationen reagiert. Der Verlauf der Kurve von *MR74* ist dagegen durch stärkere Ausreißer gekennzeichnet.

4.3.4.1.2 Calcium-Mangel

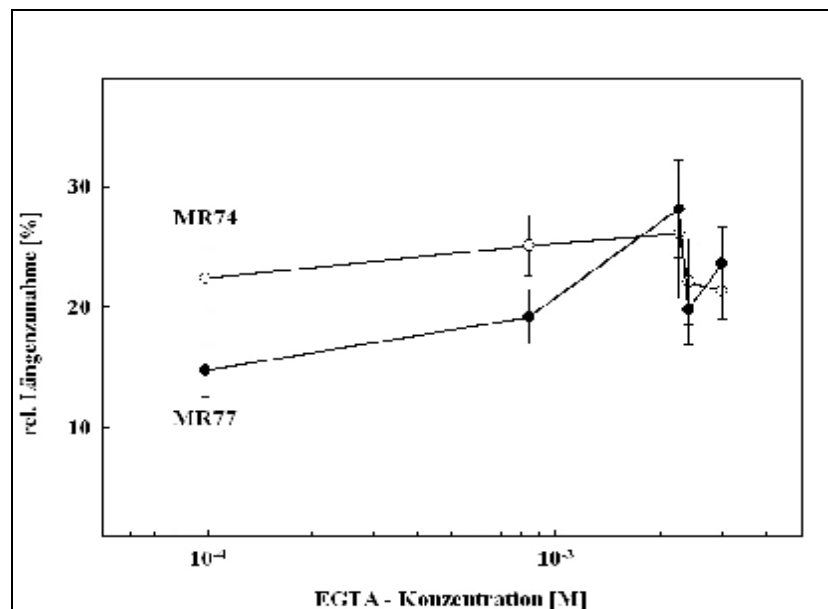


Abb. 110

Abhängigkeit der relativen Längenzunahme der Stämme *MR74*○ und *MR77*● von der EGTA-Konzentration im Inkubationsmedium. Das Längenwachstum wurde in Relation zur Ausgangslänge der Sporangiphoren gesetzt.

Während im vorigen Abschnitt der Einfluss einer Calcium-Zugabe betrachtet wurde, zeigt Abb. 110 die Resultate nach Calcium-Mangel. An den im gleichen Medium, allerdings ohne Calcium inkubierten Kontrollen zeigt sich der Einfluss des exogen zugeführten EGTA.

Über das untersuchte Konzentrationsspektrum des EGTA von $9,9 \times 10^{-5}$ – 3×10^{-3} M zeigen beide Mutanten recht ähnliches Verhalten. Mit relativen Längenzuwächsen zwischen 15 und 25% liegen *MR74* und *MR77* dicht beieinander. Ein künstlich erzeugter Ca^{2+} -Mangel scheint unter den gegebenen Versuchsbedingungen offenbar keinen deutlichen Einfluss auf das Längenwachstum der Sporangiphoren zu besitzen. Bemerkenswert ist, dass gerade im Bereich höherer EGTA-Konzentrationen kein unterschiedliches Verhalten der beiden Mutanten *MR74* und *MR77* resultiert.

4.3.4.2 Gravitrope Beugung

Nicht nur auf das Längenwachstum der Sporangiophoren, sondern auch auf die gravitrope Beugung kann Calcium einen Einfluss ausüben. Ob dieser wiederum durch die Anwesenheit der oktaedrischen Proteinkristalle moduliert wird, soll mit Hilfe der im Folgenden wiedergegebenen Ergebnisse näher geklärt werden.

4.3.4.2.1 Zugabe von Calcium

In Abb. 111 ist die relative Beugung der beiden *Phycomyces*-Mutanten *MR74* und *MR77* in Abhängigkeit von der Konzentration extern angebotenen Calciums dargestellt. Die Beugungswinkel wurden für das Längenwachstum korrigiert und zu den Kontrollen in Beziehung gesetzt. Diese nehmen den Wert Null an und sind durch die strichpunktierte Linie gekennzeichnet. Dadurch ergibt sich analog zur Darstellung des Längenwachstums eine Positiv-/Negativbilanz, wodurch Hemmung oder Förderung des Gravitropismus gegenüber den Kontrollen deutlich wird. Im unteren Konzentrationsbereich von 10^{-14}M - 10^{-9}M erfährt *MR77* eine stärkere Förderung der gravitropen Beugung als die kristalllose Mutante *MR74*. Darüber wird offenbar *MR74* stärker stimuliert.

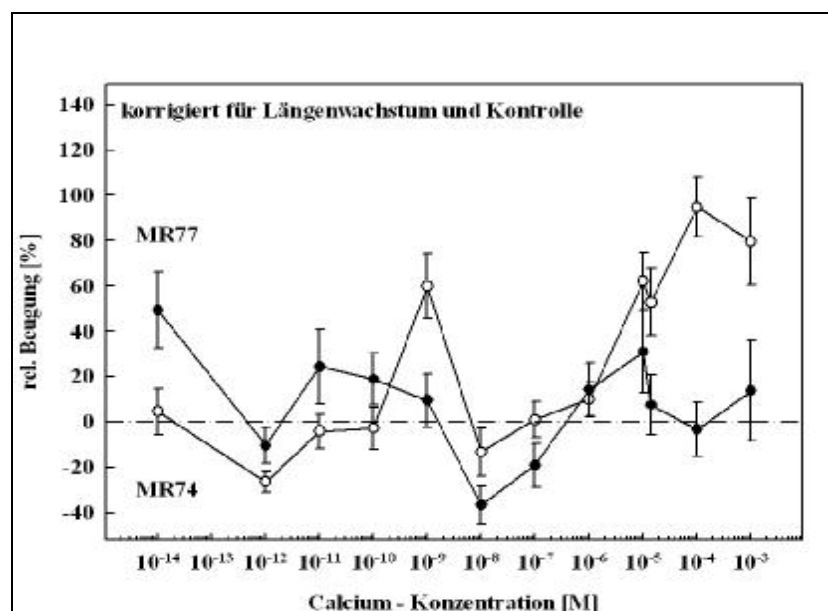


Abb. 111

Abhängigkeit der relativen gravitropen Beugung der Stämme *MR74*○ und *MR77*● von der Ca^{2+} -Konzentration im Inkubationsmedium. Die Beugungswinkel wurden für das Längenwachstum und die Kontrollen korrigiert (Kontrollen = 0, strichpunktierte Linie).

Dennoch ist der Verlauf der Kurven insgesamt eher uneinheitlich. Die Stimulierung scheint keine direkte Abhängigkeit von der Konzentration des externen Calciums zu zeigen. Es kommt vielmehr zu Schwankungen mit einer stark ausgeprägten Beugung von *MR74* bei 10^{-9} M und im Bereich um 10^{-4} M, während sich im Zwischenbereich kaum eine nennenswerte Beugung erkennen lässt. Bei beiden Mutanten ist kein Optimumsbereich der Stimulierung der gravitropen Beugung durch Calcium erkennbar. Lediglich bei *MR74* könnte sich im Bereich um 10^{-4} M ein derartiges Optimum abzeichnen. Um dies allerdings abschließend zu klären, müssen weitere Messwerte gesammelt werden. Auch die Beugung der Sporangiothoren von *MR77* ist Schwankungen unterworfen, jedoch weitaus schwächer als bei *MR74*. Es handelt sich hier, auch angesichts der Fehlerabweichung, eher nur um ein leichtes Pendeln um den Wert Null mit einem größeren Ausreißer bei 10^{-14} M Calcium.

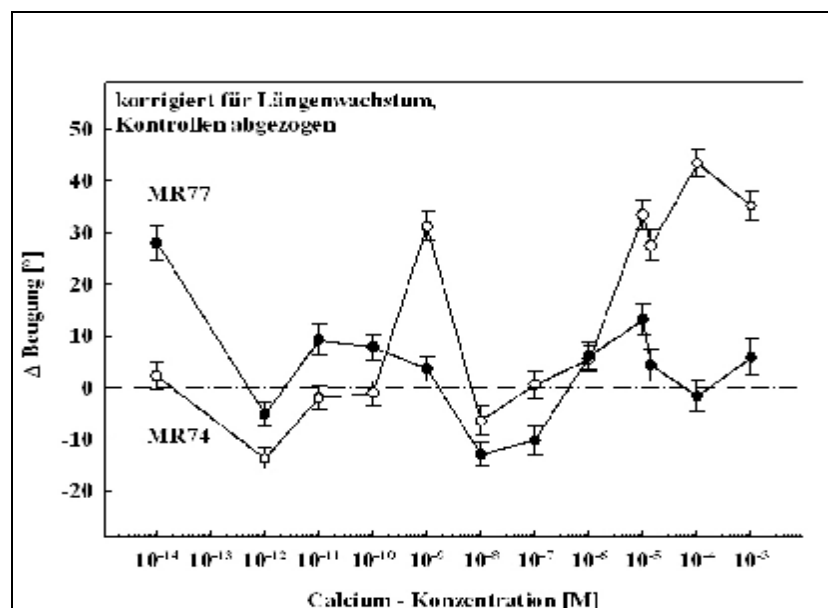


Abb. 112

Abhängigkeit der gravitropen Beugung der Stämme *MR74*○ und *MR77*● von der Ca^{2+} -Konzentration im Inkubationsmedium. Die Beugungswinkel wurden für das Längenwachstum korrigiert und als Differenz zu den Kontrollen dargestellt.

Gleiches wird deutlich, wenn man nicht die relative Beugung, sondern die absoluten Beugungswinkel betrachtet. In Abb. 112 sind diese als Differenz zu den Kontrollen wiedergegeben. Eine Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration im Aussenmedium ruft bei der Kristallmutante *MR77* weitaus schwächere Reaktionen als bei dem kristallfreien Pendant *MR74* hervor. Dort hingegen erreicht die gravitrope Beugung eine große Schwankungsbreite. Während sich die Werte von *MR77*, abgesehen von dem Ausreißer bei 10^{-14} M Ca^{2+} , nicht wesentlich von denen der Kontrollen unterscheiden, beugt sich *MR74* bei 10^{-4} M Ca^{2+} um bis zu 45° stärker als die Kontrolle. Wie im Falle des Längenwachstums scheinen die oktaedrischen Kristalle

Veränderungen oder Schwankungen der Calcium-Konzentration im umgebenden Medium zu puffern und auszugleichen.

4.3.4.2.2 Entzug von Calcium

In Abb. 113 wird gezeigt, wie sich die gravitrope Sporangiohorenbeugung der beiden Mutanten *MR74* und *MR77* in Abhängigkeit von der EGTA-Konzentration im umgebenden Medium verhält.

Ein künstlich erzeugter Ca^{2+} -Mangel durch den Zusatz von EGTA im umgebenden Medium scheint das gravitrope Beugungsverhalten der beiden Mutanten *MR74* und *MR77* in der Form zu beeinflussen, wie es sich schon bei der externen Zugabe von Ca^{2+} abgezeichnet hat. Die kristalltragende Mutante *MR77* wird offenbar weniger stark in ihrer gravitropen Beugung beeinflusst, als dies bei *MR74* der Fall ist. Dieses Verhalten erstreckt sich über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich. Bei höheren EGTA-Konzentrationen ab $2 \times 10^{-3}\text{M}$ tritt dieser Effekt jedoch stärker in Erscheinung.

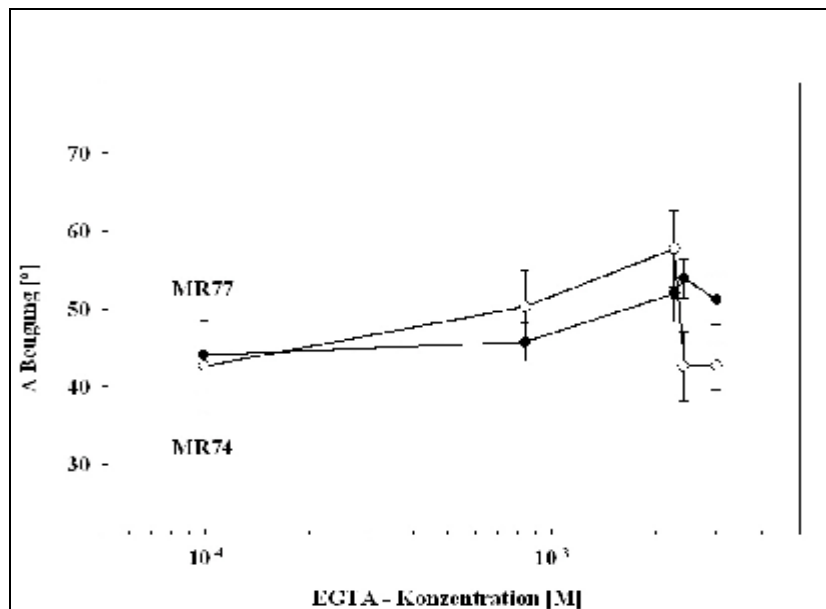


Abb. 113

Abhängigkeit der gravitropen Beugung der Stämme *MR74*○ und *MR77*● von der EGTA-Konzentration im Inkubationsmedium. Die Beugungswinkel wurden für das Längenwachstum korrigiert.

5 Diskussion

5.1 Fluoreszenzspektroskopie

5.1.1 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der oktaedrischen Kristalle

Die in der Vakuole der Sporangiphoren von *Phycomyces blakesleeanus* vorkommenden oktaedrischen Kristalle (SCHIMEK et al. 1999b) zeigen neben ihrer Proteinnatur (THORNTON, 1969, EIBEL, 1997 und EIBEL et al., 2000) auch spektroskopische Besonderheiten, die auf die Anwesenheit von flavin- und pterinartigen chromophoren Gruppen hindeuten (EIBEL, 1997 und EIBEL et al., 2000) und dem teilweise reduzierten Blaulicht-Photorezeptor *CRY1* aus *Arabidopsis thaliana* (LIN et al., 1995 und LIN, 2000) nicht unähnlich sind. Die bisher erhaltenen Befunde geben zwar erste Hinweise auf flavin- und pterinartige chromophore Gruppen, bergen aber aufgrund der gewählten Stämme und der Qualität der Reinigungsmethode noch die Gefahr der Missinterpretation.

Weitergehende Untersuchungen der spektroskopischen Eigenschaften der oktaedrischen Kristalle wurden daher zunächst an der Mutante *C171* durchgeführt. Diese ist in der β -Carotin-Biosynthese defekt, zeigt aber normale phototropische Empfindlichkeit (PRESTI et al., 1977). Die Verwendung dieser Mutante verhindert, dass das Massenzpigment β -Carotin mit seinen Absorptionsmaxima zwischen 400 und 500 nm die Signale der Absorptions- und Fluoreszenzmessungen überlagert (WOLKEN, 1969 und SCHMIDT & GALLAND, 1999). Eindeutigere Ergebnisse sind somit möglich und lassen sich besser zuordnen.

Die Besprechung der an der Mutante *C171* erhaltenen Ergebnisse soll vergleichend mit den Befunden vom Wildtyp *NRRL1555* erfolgen.

Das Absorptionsspektrum einer unbehandelten Kristallsuspension aus *C171* der Abb. 33 zeigt in seinem Verlauf gute Übereinstimmung mit den mikrospektrophotometrisch erhaltenen *in situ*-Absorptionsspektren von Kristallen von OOTAKI & WOLKEN (1973). Übereinstimmend erscheinen die Maxima im Bereich von 320-360 nm und bei etwa 450 nm. Die relativ schwach ausgeprägte Struktur des Absorptionsspektrums kann auf Verunreinigungen zurückgeführt werden. Durch Interaktion der Kristalle mit dem Suspensionsmedium hervorgerufenen Artefakte sind nicht auszuschliessen. Absorptionsanteile, die auf Lösungsmittel zurückzuführen wären, konnten durch die Verwendung eines Zweistrahlphotometers ausgeschlossen werden. Das Absorptionsspektrum kann im Vergleich mit den Spektren von OOTAKI & WOLKEN (1973) auch als eine Art Mischspektrum aus dunkeladaptierten und lichtgewachsenen Sporangiphoren

interpretiert werden. Beide Absorptionsspektren von OOTAKI & WOLKEN (1973) lassen sich mit dem Absorptionsspektrum einer Kristallpopulation in Einklang bringen. Es zeichnet sich anhand dieses Absorptionsspektrums ein Vorhandensein flavinartiger Pigmente ab. EIBEL (1997) und EIBEL et al. (2000) konnten durch Behandlung der oktaedrischen Kristalle des Wildtyp *NRRL1555* mit dem Oxidationsmittel $K_3[Fe(CN)_6]$ zeigen, dass offenbar flavinartige Komponenten mit den Kristallen assoziiert sind. Eine flavinartige Fluoreszenz trat erst nach Oxidation auf. Darüber hinaus fand sich nach Zentrifugation der Kristalle das Fluoreszenzsignal im Überstand. Dies deutete daraufhin, dass die oktaedrischen Kristalle *in situ* im reduzierten Zustand vorliegen und die flavinartige Chromophore in diesem Redoxzustand an die Kristalle gebunden zu sein scheint, wohingegen die Bindung an die Kristalle nach Oxidation gelöst wird. Die Isolierung und Reinigung der oktaedrischen Kristalle wurde in der vorliegenden Arbeit daher unter milden reduzierenden Bedingungen durch Zusatz von Dithiothreitol durchgeführt.

Die jeweilige Gegenüberstellung der Fluoreszenzanregungsspektren der oktaedrischen Kristalle von *C171* (Abb. 35) und *WT* (Abb. 51 u. 56) in den drei Oxidationsstufen (oxidiert, teilreduziert und reduziert) spiegelt deutlich die Empfindlichkeit der Kristalle gegenüber Reduktions- und Oxidationsmitteln wider und bestätigt den Redoxcharakter der mit ihnen assoziierten chromophoren Gruppen. Indirekt bestätigt dies auch, dass die Chromophoren in Abhängigkeit vom Redoxzustand ihre Bindung zum Kristall lösen. Offenbar entschied der Grad der Oxidation über die Stabilität der Kristall-Chromophor-Bindung. Denn über viele Kristallaufarbeitungen hinweg schwankte die „Ausbeute“ an flavinartiger Fluoreszenz trotz der Verwendung eines Reduktionsmittels. Bei einzelnen Aufarbeitungen war es nahezu nicht möglich, mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie flavinartige Pigmente nachzuweisen.

Es fällt auf, dass im Falle der *WT*-Kristalle das flavinartige Maximum im Blaubereich weitaus schwächer ausgeprägt ist. Darüber hinaus führt bei den Kristallen des Wildtyp eine Reduktion zu einer Fluoreszenzerhöhung im Bereich von 400 nm. Dies konnte bei *C171* so nicht beobachtet werden.

Unter dem Einfluss des milden Reduktionsmittels Dithiothreitol unterlagen die Kristalle während der Vielzahl und Dauer der Behandlungsschritte dennoch einer relativ starken Oxidation, welche möglicherweise unter Verwendung eines stärkeren Reduktionsmittels hätte unterbunden werden können. HERTEL et al. (1980) konnten in *in-vitro*-Bindungsstudien an *Cucurbita pepo* und *Zea mays* eine differentielle Riboflavinbindung in Abhängigkeit vom gewählten Reduktionsmittel feststellen. Danach bindet Riboflavin in Gegenwart von Natriumdithionit stärker als bei gleichzeitiger Behandlung mit Dithioerythritol, das wie Dithiothreitol ein 1,4-dimercapto-2,3-butandiol ist, aber dessen *erythro*-Form darstellt (RÖMPP, 1995). Eine weitere Optimierung der

Kristallisierung unter den vorgenannten Gesichtspunkten wäre daher anzustreben. Aus der Verwendung von Dithiothreitol während der Kristallisierung können die Beobachtungen von EIBEL (1997) und EIBEL et al. (2000) erhärtet werden, dass flavinartige Pigmente unter reduzierenden Bedingungen an die Kristalle binden und nach Oxidation vom Kristall dissoziieren. Diese Befunde koinzidieren mit den Ergebnissen von HERTEL et al. (1980).

Bezogen auf eine flavinartige Chromophore stimmen die drei Fluoreszenzanregungsspektren gut mit den Absorptionsspektren der drei Redoxzustände von Flavin (SCHMIDT, 2000) überein. Nach vollständiger Oxidation zeigen sich bei *C171*, jedoch nicht so ausgeprägt beim *WT* die flavintypischen Maxima bei 380 und 450 nm. Die vollständig reduzierten Kristalle besitzen dagegen ein Fluoreszenzspektrum, das mit dem Verlust der beiden Maxima dem Absorptionsspektrum des Flavin in seiner reduzierten Form nahe kommt. Beim *WT* verschiebt sich das Spektrum durch die Fluoreszenzsteigerung bei etwa 400 nm.

Das Fluoreszenzanregungsspektrum der isolierten, dann aber nicht weiter behandelten Kristalle dagegen ähnelt dem Absorptionsspektrum des radikalischen Flavosemichinons. Lediglich ein Maximum im UV-A ist sichtbar.

Da der Verlauf der Fluoreszenzanregungsspektren der Kristalle im Vergleich zu dem nicht weiter behandelten Material sowohl durch Oxidation als auch durch Reduktion deutlich verändert werden kann, bedeutet dies, dass die flavinartigen Pigmente weder im volloxydierten Zustand vorlagen noch vollständig reduziert waren. Eine Assoziation der Kristalle mit flavinartigen Pigmenten in ihrer teilweise reduzierten Semichinonform ist daher denkbar. Dies wird aus den jeweils generierten Differenzspektren deutlich und entspricht dem Absorptions- und Fluoreszenzverhalten der Flavine (GALLAND & SENGHER, 1988a und SCHMIDT, 2000).

Lokalisiert sind die Kristalle in der Zentralvakuole der Sporangiothore (SCHIMEK et al., 1999a). FLORES et al. (1999) konnten in ihren Studien über Flavinbindestellen in *Phycomyces blakesleeanus* im Bereich der Vakuole keine auf oxidierte Flavine zurückzuführende Autofluoreszenz nachweisen. Diese Befunde stehen im Einklang mit den bisher erhaltenen Ergebnissen und deuten darauf hin, dass die Kristalle *in situ* im reduzierten Zustand vorliegen.

Obwohl sich schon aus den Rohspektren deutliche Hinweise auf die Chromophorezusammensetzung der oktaedrischen Kristalle ergeben, führen erst die Differenzspektren zu genaueren Aussagen über die mit den Kristallen assoziierten chromophoren Gruppen. Die aus den Fluoreszenzspektren der Kristalle in ihren drei Oxidationsstufen (oxidiert, teilreduziert und reduziert) erzeugten Differenzspektren zeigen auch, dass neben den flavinartigen Pigmenten noch eine weitere chromophore Gruppe mit den oktaedrischen Kristallen assoziiert zu sein scheint. Würde es sich nur um eine einzige chromophore Gruppe

handeln, die an die oktaedrischen Kristalle gebunden ist, resultierte daraus auch ein einheitliches Fluoreszenzverhalten nach Reduktion und Oxidation. Beispielsweise wäre im Falle einer flavinartigen Chromophore eine Fluoreszenzlöschung nach Reduktion über den gesamten untersuchten Wellenlängenbereich zu erwarten (GALLAND & SENGGER, 1988a und SCHMIDT, 2000). Der Vergleich mit der entsprechend behandelten Referenzsubstanz Riboflavin (Abb. 68) bestätigt dies. Die Tatsache aber, dass eine Löschung der Fluoreszenz nur in einem Teilbereich stattfindet, bedeutet, dass eine weitere chromophore Gruppe vorhanden sein muss.

Wird die Fluoreszenz der reduzierten Kristalle von der der oxidierten Kristalle subtrahiert, resultieren die Differenzanregungsspektren der Abb. 36 (*C171*) u. 52 (*WT*), die zu dem Fluoreszenzanregungsspektrum der Referenzsubstanz Riboflavin nur wenig Ähnlichkeit besitzt. Gegen ein flavinartiges Pigment als alleinige chromophore Gruppe spricht einerseits die große Differenz in der Signalstärke zwischen den beiden Maxima. Andererseits entspricht die Lage des Maximums im UV/A nicht dem eines Flavins. Während das Maximum im Blau noch recht gut übereinstimmt, ist das Maximum im nahen UV hypsochrom verschoben. Ein flavintypisches Maximum in diesem Bereich erscheint bei 370 – 380 nm. Das UV-Maximum des Differenzspektrums liegt jedoch bei 340-350 nm und lässt sich somit nicht einer flavinartigen Chromophore zuordnen. Das Maximum bei 450 nm ist im Falle der *WT*-Kristalle kleiner als bei *C171*. Die bei *C171* beobachtbare Schulter bei 370 nm fehlt beim *WT*. Darüber hinaus ist bei den Kristallen des Wildtyp eine Schulter bei 400 nm zu erkennen. Diese ausgeprägte Schulter spricht einerseits für eine veränderte Chromophorenzusammensetzung der Wildtypkristalle gegenüber denen von *C171*, kann andererseits aber auch aus weniger reduktiven Isolierungsbedingungen resultieren, da die Schulter bei 400 nm nach Reduktion verstärkt werden kann.

Wäre der Oxidationsschutz während der Isolierung der Kristalle maximal, würden die Chromophoren in ihrem reduzierten Zustand vorliegen und die nachträgliche Behandlung mit Reduktionsmittel würde in diesem Bereich keine Erhöhung der Fluoreszenz bewirken.

Warum aber auch nach Oxidation bei den Kristallen des *WT* eine Fluoreszenzverstärkung bei 400 nm auftritt, ist damit nicht erklärbar. Ein möglicher Grund ist das Vorhandensein einer weiteren chromophoren Gruppe, die bei der gleichen Wellenlänge, jedoch nach Oxidation Fluoreszenz zeigt. Gegen ein Artefakt spricht, dass die Kontrollspektren des Puffers und der Zusätze bei dieser Wellenlänge keine Fluoreszenz zeigen.

Die Fluoreszenzanregungsdifferenzspektren der Abb. 37 (*C171*) u. 53 (*WT*), bei deren Aufnahme die Emission bei der pterintypischen Wellenlänge von 440 nm fixiert worden ist, Flavine in diesem Bereich aber keine Fluoreszenz emittieren, sprechen stark für eine pterinartige

chromophore Gruppe und erhärten damit die ersten Beobachtungen von EIBEL (1997) und EIBEL et al. (2000). Dies steht auch im Einklang mit früheren Beobachtungen, dass neben flavinartigen Pigmenten in *Phycomyces blakesleeanus* eine zweite, im nahen UV absorbierende Chromophore vorhanden ist (GALLAND & LIPSON, 1985a u. b, KIEWISCH & FUKSHANSKY, 1991 und HOHL et. al., 1992a).

Das Maximum bei 350 nm ist bei den Kristallen des *WT* im Gegensatz zu *C171* bis etwa 380 nm verbreitert und wird zusätzlich noch durch die Schulter bei 400 nm flankiert. Beides deutet auf zusätzliche chromophore Gruppen oder Kofaktoren hin. Weitere pterinartige Pigmente als chromophore Gruppen kommen in Betracht. Das Spektrum der Anregungswellenlängen von Pterinen (BROWN et al., 1986, KIEWISCH & FUKSHANSKY, 1991 und HOHL et al, 1992a) steht damit in Einklang. Lumazin und seine Derivate absorbieren ebenfalls im Bereich um 400 nm (GALLAND, 1992). 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin ist eine Biosynthesestufe von Riboflavin (GALLAND, 1992).

Das im Zuge der Isolierung der oktaedrischen Proteinkristalle von *Phycomyces blakesleeanus* aufgrund mangelnden Schutzes vor Oxidation flavinartige Chromophore dissoziiert sind und verloren gingen, manifestiert sich auch an den beiden Differenzspektren, die einerseits aus teilreduzierten und vollständig reduzierten Kristallen („DTT-red“) und andererseits aus oxidierten und teilreduzierten Kristallen („ox-DTT“) gewonnen wurden (*C171*, Abb. 38-40; *WT*, Abb. 54 u. 55). Die aus teilreduzierten und vollständig reduzierten Kristallen resultierenden Fluoreszenzdifferenzanregungsspektren deuten mit dem Maximum bei 340 nm auf ein pterinartiges Pigment hin. WANG et al. (1988) konnten als zweite Chromophore ein an Position 5 und 6 substituiertes 7,8-Dihydropterin für die DNA-Photolyase von *Escherichia coli* nachweisen. JOHNSON et al. (1988) identifizierten 5,10-Methenyltetrahydrofolat als zweite Chromophore der DNA-Photolyase von Hefe und *Escherichia coli*. Das Fluoreszenzspektrum der Vergleichssubstanz L-Monapterin stimmt in der Lage des Maximums sehr gut mit dem Spektrum der oktaedrischen Kristalle in Abb. 40 überein. Zu berücksichtigen ist, dass die Fluoreszenzemission bei der flavintypischen Wellenlänge von 530 nm fixiert wurde, die Vergleichssubstanz L-Monapterin nach Anregung bei 356 nm hier auch noch zu einem geringen Teil Fluoreszenz emittiert (Abb. 73).

Die bis etwa 390 nm ausgezogene Schulter und die oberhalb von 400 nm noch vorhandene geringe Fluoreszenz können unter den gewählten Bedingungen von einem Flavosemichinon herrühren (GALLAND & SENGGER, 1988a und SCHMIDT, 2000).

Das bathochrom nach 470-480 nm verschobene Maximum im Differenzspektrum „DTT-red“ der *WT*-Kristalle deutet ebenfalls auf Flavosemichinone (GALLAND & SENGGER, 1988a und

SCHMIDT, 2000) hin. Flavosemichinone kennzeichnet weiterhin ein hypsochrom verschobenes UV/A-Maximum (GALLAND & SENGGER, 1988a und SCHMIDT, 2000), welches durch die Überlagerung durch pterinartige Fluoreszenz möglicherweise nicht detektiert werden kann.

Auf eine starke Überlagerung durch Fluoreszenz von pterinartigen Pigmenten spricht auch der Vergleich des Differenzspektrums „ox-DTT“ der Kristalle des *WT* mit dem Absorptionsspektrum von Riboflavin (Abb. 55). Während das Maximum im nahen UV stark ausgeprägt ist, fehlt das Maximum im Blau. Dieser Befund deutet darauf hin, dass während der Isolierung der Kristalle der Oxidationsschutz nicht ausreichend war und ein Großteil der flavinartigen Chromophore deshalb im oxidierten Zustand die Bindung zum Kristall verloren hat. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von EIBEL (1997) und EIBEL et al. (2000).

Weiter sind die Beobachtungen, dass die flavinartigen Chromophoren offenbar abhängig vom Redoxzustand ihre Bindung zum Proteinkristall verändern, ein starker Hinweis auf eine nicht-kovalente Bindung zwischen ihnen und den Kristallen. Dies deckt sich mit Hinweisen von GALLAND et al. (1990) über die Chromophorenbindung am Paraflagellarkörper von *Euglena gracilis*. LIN et al. (1995) und CHRISTIE et al. (1998) konnten ebenfalls diese Art der Bindung zwischen Flavinen und *CRY1* aus *Arabidopsis thaliana* zeigen. Die leichte Schulter bei 400 nm lässt sich auch hier nicht eindeutig zuordnen. Pterine können in diesem Bereich durchaus auch Fluoreszenz zeigen (BROWN et al., 1986). Eine zweite Aufarbeitung oktaedrischer Kristalle aus Wildtyp lässt ebenso erkennen, dass die flavinartige Fluoreszenz gegenüber jener der pterinartigen Pigmente zurücktritt (Abb. 56). Jedoch zeigte der Vergleich mit der Referenzsubstanz Riboflavin eine stärkere auf flavinartige Pigmente zurückzuführende Fluoreszenz (Abb. 57). Die starke Fluoreszenz bei 400 nm wird hier wieder deutlich. Durch eine schonendere Behandlung der Kristalle konnte ein größerer Anteil flavinartiger Chromophore isoliert werden, als in der anderen *WT*-Kristallaufarbeitung.

Das entsprechende Differenzspektrum der Kristalle aus *C171* zeigt dagegen in sehr guter Übereinstimmung das Vorhandensein von flavinartigen Pigmenten (Abb. 39). Die nicht exakte Übereinstimmung der Höhe der beiden Maxima im Blau hat ihre Ursache möglicherweise in der Zusammensetzung der jeweiligen Lösungen. Im Gegensatz zu der Referenzsubstanz muss im Falle der Kristallsuspensionen damit gerechnet werden, dass aufgrund der Behandlung mit Reduktions- und Oxidationsmitteln einerseits und der Proteinumgebung andererseits physikochemische Veränderungen die Fluoreszenz beeinflussen und zu einer veränderten Quantenausbeute führen können (SCHMIDT, 2000). Ein weiterer Faktor können Geräteartefakte darstellen. Diese wurden zwar mit Hilfe der Korrektur weitestgehend eliminiert, scheinen aber nicht vollständig beseitigt worden zu sein. Auch die Korrektur selbst kann in gewisser Weise den

Verlauf der Spektren verändern (vgl. Korrekturfaktor, Abb. 20). Der steile Abfall der Flanke unterhalb von 350 nm und das verstärkte Rauschen in diesem Bereich deuten auf die beiden letztgenannten Möglichkeiten hin.

Die genauere Analyse einer auf pterinartigen Pigmenten beruhenden Fluoreszenz gelingt, wenn die Fluoreszenzemission bei 440 nm fixiert wird. Bei der jeweiligen Gegenüberstellung der Fluoreszenzanregungsspektren aller drei Oxidationsstufen in Abb. 41 (*C171*), 53 u. 58 (*WT*) wird deutlich, dass die pterinartigen Chromophoren während der Kristallisolierung weitestgehend im oxidierten Zustand vorgelegen haben. Die nachträgliche Oxidation verursacht im Bereich von 350 nm nahezu keine Zunahme der Fluoreszenz. Dagegen sind die flavinartigen Pigmente in reduzierter oder teilreduzierter Form mit den Kristallen verbunden. Auch die Schwankungen in der flavinartigen Fluoreszenz, die so im Falle der pterinartigen Pigmente nicht in Erscheinung trat, lässt sich damit erklären. Selbst unter den während der Kristallisolierung herrschenden oxidierenden Bedingungen scheint die Bindung zwischen pterinartigen Chromophoren und Kristallen stabil zu sein, während die flavinartigen Pigmente schwächer mit den Kristallen assoziiert sind.

Eine Besonderheit stellt das zweite Maximum bei 380 nm dar. Sowohl eine Oxidation als auch eine Reduktion führen zu einer Zunahme der Fluoreszenz. Die Zunahme der Fluoreszenz bei 380 nm nach Oxidation ist stärker als bei 350 nm. Dies kann darauf hindeuten, dass es beispielsweise zu Modifikationen von Seitengruppen der pterinartigen chromophoren Gruppen kommt oder eine vom Redoxzustand abhängige Veränderung der Proteinumgebung stattfindet, wodurch sich Änderungen der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften ergeben können. Abhängig vom Redoxzustand oder pH-Wert treten Absorptionsmaxima auch oberhalb von 350 nm auf (GALLAND & SENGER, 1988b). Weiter muss berücksichtigt werden, dass es sich im Gegensatz zur Vergleichssubstanz im Falle der oktaedrischen Kristalle nicht zwingend um eine einzelne pterinartige Chromophore handelt. Möglicherweise liegt ein Gemisch derartiger chromophorer Gruppen mit verschiedenen Fluoreszenzanregungsmaxima vor. HOHL et al. (1992a) konnten eine ganze Reihe von Pterinen in *Phycomyces blakesleeanus* nachweisen. Hypsochrome Verschiebungen der Maxima zum kürzerwelligen oder bathochrom zum längerwelligen Bereich treten abhängig vom Lösungsmittel, dessen Polarität, der Temperatur oder dem pH-Wert auf (WANG et al., 1988 und SCHMIDT, 2000). Anregungsmaxima im Bereich von 340 nm bis 380 nm sind typisch für Pterine (KIEWISCH & FUKSHANSKY, 1991 und HOHL et al., 1992a). Da die Emission bei 440 nm fixiert wurde, scheidet ein flavinartiges Pigment in diesem Falle aus. Aus dem Verlauf der Anregungsspektren der oxidierten und teilreduzierten Kristalle in Abb. 41 wäre eine weitere Verringerung des Maximums bei 380 nm

nach stärkerer Reduktion zu erwarten. Die paradoxe Zunahme deutet daher auf ein Artefakt hin. Für ein artifizielles Fluoreszenzmaximum spricht, dass die Referenzsubstanz L-Monapterin lediglich bei 350 nm ein Maximum bildet (Abb. 74). Anhand der Kontrollspektren der Abb. 74 u. 78 wird ersichtlich, dass das nach Reduktion von L-Monapterin verbliebene Maximum bei 380 nm auf Pufferartefakte zurückzuführen ist. Erst der Zusatz von Natriumdithionit lässt ein starkes Fluoreszenzmaximum bei 380-390 nm entstehen. Auch der Natriumphosphatpuffer zeigt in diesem Bereich Fluoreszenz, dessen Anteil jedoch gegenüber dem des Reduktionsmittels vernachlässigbar ist. Das Differenzspektrum aus oxidierten und teilreduzierten Kristallen von *C171* („ox-DTT“) in Abb. 42 stützt ebenfalls die Hypothese, dass neben den flavin- auch pterinartige Chromophore mit den oktaedrischen Kristallen assoziiert sind. Die im Gegensatz zu den *WT*-Kristallen geringe Ausprägung des Maximums bei 350 nm im Falle von *C171* ist zu erwarten, da der Fluoreszenzunterschied in Abb. 41 zwischen oxidierten und teilreduzierten Kristallen gering ist.

Sehr ausgeprägt dagegen ist die Fluoreszenz bei *C171* bei 375-380 nm mit einer Schulter bei 400 nm, die auch bei den *WT*-Kristallen wieder auftritt. Die Lage des Maximums spricht nicht gegen ein pterinartiges Pigment als weitere Chromophore. So kommt es beispielsweise bei methylierten Pterinen zu einer bathochromen Verschiebung des Maximums im nahen UV (HOHL et al, 1992a). Aus dem Vergleich mit den Anregungsspektren von L-Monapterin (Abb. 74) wird jedoch ersichtlich, dass auch bei 380 nm noch erhebliche Fluoreszenzanregung besteht. Dies spricht trotz des möglichen Artefaktes wiederum für ein pterinartiges Pigment.

Das verbreiterte Maximum bei *WT* sowie das Fehlen des 350 nm-Maximums bei *C171* kann auf das Vorliegen mehrerer pterinartiger Chromophore hindeuten. Berücksichtigt man, dass Veränderungen des Redoxzustandes oder des pH-Wertes zu einer Beeinflussung der Mikroumgebung und damit der Bindungsverhältnisse, sowie einer Änderung in der Elektronenhülle führen können (SCHMIDT, 2000), stützen auch die Differenzspektrum „ox-DTT“ sowohl aus *WT* als auch aus *C171* die Beobachtung, dass neben flavin- pterinartige chromophore Gruppen vorhanden sind.

Ob andere redoxsensitive Komponenten der Signaltransduktion für diese Fluoreszenz verantwortlich sind, kann jedoch an dieser Stelle nicht näher geklärt werden.

NADH als weiterer möglicher Kofaktor kann hier jedoch ausgeschlossen werden. Es emittiert Fluoreszenzlicht im Bereich von 450 - 460 nm, dies aber nur in seiner reduzierten Form. Gleiches gilt für die Fluoreszenzanregung bei etwa 340 – 350 nm. Da es sich aber bei der beobachteten Fluoreszenz um solche nach Oxidation handelt, scheidet NADH aus. Dennoch

zeigt NADH nach Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]$ ein schwaches Maximum bei 350 – 360 nm (Abb. 76), was auf ein Artefakt hinweist.

Flavine emittieren typischerweise bei etwa 530 nm (GALLAND & SENGGER, 1988a; BRODHUN & HÄDER, 1990; HOHL et al., 1992b; FLORES et al., 1999 und SCHMIDT, 2000). Die flavinartige Natur einer der an die oktaedrischen Kristalle assoziierten Chromophore wurde klar gezeigt. Erst nach Oxidation lässt sich ein Emissionsmaximum bei 530 nm detektieren. Dies wird bei der Gegenüberstellung der Einzelspektren der Kristalle in ihren drei Oxidationsstufen deutlich, aber auch durch die Differenzspektren bei *C171* (Abb. 43 ff.) und *WT* (Abb. 60 ff.).

Im reduzierten Zustand ist keine Fluoreszenzemission bei 530 nm detektierbar, da Flavine bei der korrespondierenden Anregungswellenlänge von 470 nm dann nicht absorbieren (GALLAND & SENGGER, 1988a und SCHMIDT, 2000). Flavosemichinon absorbiert dort nur schwach und zeigt daher nur geringe Fluoreszenzemission bei 530 nm. Allen drei Emissionsspektren gemeinsam ist ein Maximum bei 560 nm. Aufgrund der Kontrollspektren der Abb. 77 handelt es sich bei diesem Maximum um Pufferartefakte. Alle Kombinationen des Aufschlusspuffers mit sämtlichen Zusätzen haben ebenfalls ein Maximum bei etwa 560 nm gezeigt. Nach Anregung bei 470 nm zeigt das jeweilige Differenzspektrum zwischen oxidierten und reduzierten Kristallen von *WT* und *C171* die für Flavine typische Fluoreszenzemission bei 525-530 nm (Abb. 44 u. 61). Die Kontrolle mit Riboflavin (Abb. 72) stützt diesen Befund. Dennoch ist es möglich, dass anhand von Fluoreszenz in diesem Wellenlängenbereich Pterine nachweisbar sind (GALLAND & SENGGER, 1988b). Dies steht nicht im Gegensatz zu den bisher erhaltenen Ergebnissen, sondern untermauert die Hypothese, dass mit den oktaedrischen Kristallen flavin- und pterinartige Pigmente assoziiert sind. Die Emissionsspektren zeigen nach Anregung bei 470 nm sehr starken Flavincharakter. Dagegen spricht das jeweilige Differenzspektrum nach Anregung bei 350 nm mit seinem Emissionsmaximum bei 440 nm sowohl für *C171* als auch *WT* (Abb. 45 u. 63) für die Existenz von pterinartigen Chromophoren.

Der Gemischcharakter der Chromophoren wird deutlich, wenn die Fluoreszenzanregung bei 380 nm stattfindet (Abb. 46 u. 62). Das Emissionsspektrum von *C171* besitzt zwei Maxima. Das erste bei 440 nm kann einem pterinartigen Pigment zugeordnet werden, während das zweite Maximum bei 530 nm die Existenz eines flavinartigen Chromophors dokumentiert. Dieses tritt bei den *WT*-Kristallen nur äußerst schwach in Erscheinung.

Aus diesem Vergleich wird deutlich, dass die „Ausbeute“ an flavinartigen chromophoren Gruppen aufgrund des mangelnden Oxidationsschutzes gering ausfiel, wovon pterinartige Chromophore offenbar weniger betroffen waren.

Die Differenzspektren „ox-DTT“ und „DTT-red“ der Kristalle des *WT* (Abb. 64) sind im Vergleich zu den entsprechenden Spektren der Kristalle aus *C171* (Abb. 47) ebenfalls ein Hinweis dafür, dass bei dieser Kristallisierung aufgrund mangelnden Oxidationsschutzes sehr wenig flavinartiges Pigment nachgewiesen werden konnte. Lediglich das Differenzspektrum „ox-DTT“ zeigt ein schwaches Maximum bei 530 nm und damit die für Flavine charakteristische Fluoreszenzemission.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass die flavinartigen Chromophoren im überwiegend reduzierten Zustand an die Kristalle gebunden sind. Die Fluoreszenzdifferenz im Falle von *C171* zwischen oxidierten und unbehandelten Kristallen („ox-DTT“) ist größer als zwischen unbehandelter und reduzierter Probe („DTT-red“) und das Maximum bei 530 nm ist stärker ausgeprägt. Das sehr schwache Maximum bei 530 nm des Differenzspektrums „DTT-red“ kann auf eine Oxidation während der Kristallisierung hindeuten.

Dennoch können flavinartige Chromophore bei *C171* und *WT* klar nachgewiesen werden (Abb. 61 u. 65), wie aus dem Vergleich mit der Referenzsubstanz Riboflavin hervorgeht. Ein weiterer Hinweis für die geringe Konzentration flavinartiger Pigmente wird auch am starken Rauschen der Fluoreszenzspektren im Vergleich mit reinem Riboflavin deutlich.

Ein weiterer Befund, der die Existenz von flavin- und pterinartigen Chromophoren erhärtet und den Gemischecharakter der Kristallchromophoren bestätigt, ergibt ein Vergleich der Fluoreszenz der Kristalle aus *C171* mit der Fluoreszenz eines Gemisches aus Riboflavin und L-Monapterin (Abb. 49). Die jeweiligen Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren sind nahezu identisch. Lediglich die Lage des Maximums im nahen UV weicht von der des Gemisches etwas ab. Zwei Ursachen können hierfür in Betracht gezogen werden. Bei dem Gemisch handelt es sich um eine wässrige Lösung in Natriumphosphatpuffer, wogegen im Falle der Kristalle eine Proteinumgebung vorliegt. Darüberhinaus besteht das Vergleichsgemisch nur aus den beiden Einzelsubstanzen, während die Kristalle mit Gruppen pterin- und flavinartiger Pigmente assoziiert sein können. Diese Unterschiede können zu einer spektralen Verschiebung führen. Außerdem sind weitere, bisher nicht identifizierte Kofaktoren der Signaltransduktionskette anzunehmen, wodurch ebenfalls Veränderungen in der Fluoreszenzcharakteristik auftreten können.

Die Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren zeigen einerseits, dass mit den Kristallen des Wildtyps *NRRL1555* und der Mutante *C171* sowohl flavin- als auch pterinartige Chromophore assoziiert sind. Der Vergleich zweier Aufarbeitungen von oktaedrischen Kristallen des Wildtyp dokumentiert die Schwierigkeiten, die sich auch schon an den Fluoreszenzdaten von Wildtyp und *C171* abgezeichnet haben. Trotz des gegenüber EIBEL (1997) optimierten

Isolierungsverfahrens waren Schwankungen in der Chromophorenausbeute unvermeidbar. Während der zahlreichen Reinigungs- und Anreicherungs-schritte war es schwierig, konstante Bedingungen für einen optimalen Oxidationsschutz zu gewährleisten. Der Isolierungsprozess und die damit verbundenen Manipulationen waren schwierig soweit zu standardisieren, dass eine gleichbleibend hohe Qualität und Unversehrtheit der Proteinkristalle resultierte. Unversehrtheit der Kristalle in dem Sinne, dass alle mit ihnen *in vivo* assoziierten chromophoren Gruppen unter den Isolierungsbedingungen erhalten werden konnten. Zahlreiche Arbeitsschritte waren zur Bereitstellung der oktaedrischen Proteinkristalle in dieser Qualität und Quantität notwendig, um die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen durchführen zu können. Ob neben den technisch bedingten Unterschieden auch Variationen in der Chromophorenzusammensetzung der Kristalle genetischer Natur vorliegen, kann hier nicht geklärt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen identifizieren sowohl für den Wildtyp *NRRL1555* als auch für die Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus* flavin- und pterinartige Pigmente als mit den oktaedrischen Proteinkristallen assoziierte Stoffgruppen. Für flavinartige Chromophore konnte gezeigt werden, dass sie im reduzierten Zustand an die oktaedrischen Kristalle gebunden sind. Die pterinartigen Chromophore dagegen sind in oxidiertem Zustand mit den Kristallen assoziiert. Dies steht zumindest teilweise im Einklang mit Ergebnissen von LIN et al. (1995) an *Arabidopsis thaliana*. Sie fanden Flavin als Blaulicht-Photorezeptor im reduzierten Zustand mit *CRY1* assoziiert vor, während das Absorptionsspektrum der freien Chromophore dem des voll oxidierten FAD entspricht. Die Ergebnisse stimmen aber auch mit denen von FLORES et al. (1999) überein. Auf oxidierte Flavine zurückzuführende Fluoreszenz war im Bereich der Vakuole nicht detektierbar. Hinweise auf ein gemeinsam mit FAD an einem zur *CRY1*-Photolyase homologen Fusionsprotein gebundenen Methenyltetrahydrofolat (MALHOTRA et al., 1995) decken sich mit den eigenen Ergebnissen. Weiter stehen die aus den Untersuchungen der Kristalle des Wildtyp erhaltenen Ergebnisse mit den Befunden von LIN et al. (1995) und CHRISTIE et al. (1998) im Einklang, dass die Flavine mit ihrer Proteinumgebung eine nicht-kovalente Bindung eingehen.

Nur die Dihydro- und Tetrahydroform der Pterine scheinen in der Natur eine Rolle zu spielen, wogegen vollständig oxidierten Pterine nicht bekannt sind (GALLAND & SENGGER, 1988b). Dies spricht dennoch nicht gegen die Bindung der Pterine an die Kristalle in ihrer oxidierten Form.

GALLAND et al. (1990) diskutieren neben der Flavinbindung auch die Art der Bindung der Pterine an den Paraflagellarkörper bei *Euglena gracilis* als nicht-kovalent, was auch für die oktaedrischen Kristalle gilt.

Es ist deutlich geworden, dass die Entschlüsselung eines möglicherweise recht komplexen Gemisches verschiedener Chromophoren, Kofaktoren und Redoxpartner noch weiterer Untersuchungen und des Einsatzes anderer Methoden bedarf. Dennoch besteht kein Zweifel daran, dass die oktaedrischen Kristalle mit flavin- und pterinartigen Chromophoren interagieren. Eine Elektronenübertragung von pterin- auf flavinartige chromophore Gruppen als Teilschritt in der Signaltransduktion, wie bei den Cryptochromen in Anlehnung an die DNA-Photolyase diskutiert (LIN, 2000, SANCAR, 2003 und GALLAND & TÖLLE, 2003) ist daher möglich.

5.1.2 Methanolische Extraktion der Proteinkristalle

Aus den bisher besprochenen fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen hat sich deutlich abgezeichnet, dass die Bindung der flavinartigen Chromophore nicht-kovalenter Natur ist. Die pterinartigen Pigmente scheinen zwar stärker als die flavinartigen Chromophore gebunden zu sein; eine nicht-kovalente Verknüpfung mit den Proteinkristallen scheint aber auch hier möglich. Sowohl die Anregungsspektren als auch die Emissionsspektren des klaren Überstandes methanolisch extrahierter Kristalle zeigen, dass flavin- und pterinartige Pigmente mit den oktaedrischen Proteinkristallen assoziiert sind. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass es sich bei dem methanolischen Extrakt um ein Gemisch aller mit den Kristallen assoziierter chromophorer Gruppen, Redoxpartner und weiterer bisher nicht identifizierter Komponenten handelt. Dies erschwert eine genaue Analyse. Der Vergleich der Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektren mit einem aus Riboflavin und L-Monapterin hergestellten Gemisch zeigt daher auch keine perfekte Übereinstimmung (Abb. 67). Insbesondere das Maximum bei 410 nm stellt eine Besonderheit dar, deckt sich aber mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen an den isolierten Kristallen. Auch dort konnte wiederholt ein Fluoreszenzanregungsmaximum im Bereich dieser Wellenlänge nachgewiesen werden. Während das Maximum im UV-A deutlich für ein pterinartiges Pigment spricht und die Schulter bei etwa 370 nm zusammen mit dem Maximum bei 450/460 nm flavinartige Chromophore repräsentiert, kann das Maximum bei 410 nm weiteren pterinartigen chromophoren Gruppen zugerechnet werden. Dies steht zu dem relativ breiten Spektrum der Anregungswellenlängen für Pterine nicht im Widerspruch. (BROWN et al., 1986, KIEWISCH & KUKSHANSKY, 1991 und HOHL et al, 1992a).

Zusätzlich müssen spektrale Verschiebungen aufgrund der Lösungsmiteileinflüsse und der durch die Desintegration der Proteine veränderten Mikroumgebung berücksichtigt werden (SCHMIDT,

2000). Dadurch hervorgerufene strukturelle Modifikationen der Chromophoren können ebenfalls die Fluoreszenzeigenschaften beeinflussen (KIEWISCH & FUKSHANSKY, 1991).

Das Lumazinderivat 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, eine Riboflavinvorstufe, absorbiert oberhalb von 400 nm, während Lumazin selbst unterhalb 400 nm absorbiert (GALLAND, 1992)

Die methanolische Extraktion isolierter Proteinkristalle bestätigt trotz der zu berücksichtigenden Einschränkungen eindeutig die bereits vorliegenden Ergebnisse über eine nicht-kovalente Bindung sowohl flavin- als auch der pterinartiger Pigmente an die oktaedrischen Proteinkristalle und stützt darüber hinaus Hinweise auf die Existenz weiterer als Chromophoren oder Redoxpartner dienender pterinartiger Pigmente.

5.1.3 Flavinbindungsstudien

Flavin- und pterinartige Chromophore konnten anhand der Fluoreszenzspektroskopie klar an den oktaedrischen Kristalle des Wildtyps *NRRL1555* und der Mutante *C171* von *Phycomyces blakesleeanus* nachgewiesen werden. Ihre Bedeutung in der Signaltransduktion des Gravitropismus als mit den Kristallen assoziierte chromophore Gruppen oder Redoxpartner wird dadurch unterstrichen. Ob eine Interaktion der Chromophoren mit der Proteinumgebung stattfinden kann, wurde daher auch durch Bindungstests exemplarisch mit Riboflavin untersucht.

Weiter zeigt sich klar, dass mit steigender Konzentration des exogen applizierten Riboflavin auch die Konzentration gebundenen Riboflavins zunimmt. Dies allerdings erst ab einem Schwellenwert von 10^{-7} beziehungsweise 10^{-6} M. Dass diese Bindung relativ stabil ist, wird daran deutlich, dass selbst nach zweimaligem Zentrifugieren und Waschen noch Flavinfluoreszenz nachgewiesen werden kann. Die hier erhaltenen Befunde bestätigen einerseits die Bindung von flavinartigen Chromophoren an die Kristalle, unterstreichen andererseits auch den nicht-kovalenten Charakter der Assoziation sowie deren Abhängigkeit von den Redoxbedingungen. Die Konzentration gebundenen Riboflavins steigt schon ab 10^{-7} M exogen applizierten Riboflavins. Dagegen wird der Schwellenwert im oxidierten Zustand erst ab 10^{-6} M exogen angebotenem Riboflavin überschritten.

Ab einer Konzentration von 10^{-4} M exogen appliziertem Riboflavin scheint die Bindung eine Sättigung zu erfahren und alle Bindungsstellen am Kristall besetzt zu sein. Durch Überschreiten des Löslichkeitsproduktes des Riboflavin in wässriger Lösung oberhalb von 10^{-4} M ist eine Aussage hierrüber jedoch nur eingeschränkt möglich. Die Abschätzung der maximalen

Bindungsstellen bestätigt eine stärkere Bindung von flavinartigen Pigmenten an die Kristalle im reduzierten Zustand. Die Zahl der Bindungsstellen ist dagegen bei oxidierten Kristalle verringert.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien bestätigen alle bisher erhaltenen Hinweise auf eine Bindung der flavinartigen Chromophore an die Proteinkristalle. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass Riboflavin unter reduzierenden Bedingungen stärker an die Kristalle bindet als unter oxidierenden Bedingungen. Dies konnte deutlich durch den jeweiligen fluoreszenzspektroskopischen Vergleich der reduzierten und oxidierten Kristalle (Abb. 85) gezeigt werden. Die Dissoziationskonstanten für die *in vitro*-Bindung von Riboflavin an reduzierte (K_D : $2,8 \times 10^{-5} \text{ M}$) und oxidierte Kristalle (K_D : $6 \times 10^{-5} \text{ M}$) bestätigen dies. Die Ergebnisse stehen mit Befunden von DOHRMANN (1983) in Einklang, wonach die Affinität der Bindestellen für Riboflavin durch Zugabe von Natriumdithionit erhöht wurde.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann eine ähnliche Art der Bindung auch für die pterinartigen Pigmente angenommen werden. Dies stützt die Hypothese, dass über die Bindung an die oktaedrischen Kristalle in *Phycomyces blakesleeanus* neben ihrer Funktion als Photorezeptoren pterin- und flavinartige Chromophoren als Redoxpartner in der Signalweiterleitung des Photogravitropismus fungieren.

5.2 Stöchiometrische Abschätzungen der Flavinbindung

Anhand der Daten aus der Dichtebestimmung und der elektrophoretischen Auftrennung der oktaedrischen Proteinkristalle in einer denaturierenden SDS-PAGE, sowie den Ergebnissen aus den Bindungsstudien mit Riboflavin und der quantitativen Proteinbestimmung ergeben sich Hinweise über die stöchiometrischen Verhältnisse der Kristall-Flavin-Bindung.

Die Zahl der Bindungsstellen pro Kristall schwankt in Abhängigkeit von dessen Redoxzustand zwischen $7,4 \times 10^8$ (oxidiert) und $7,7 \times 10^8$ (reduziert) sowie 8×10^8 (weiteres Experiment mit unbehandelten Kristallen). Da es sich lediglich um Abschätzungen handelt, stimmen die Werte in ihrer Größenordnung überein. Die errechnete Zahl von 5,26 gebundenen Molekülen pro Proteinmonomer bei 10^{-4} M Riboflavin in der Kristallsuspension muss aber mit Zurückhaltung bewertet werden, da es sich hierbei nur um Abschätzungen handelt. Genauere Berechnungen sind derzeit nicht möglich. Zu Grunde gelegt wurde eine gleiche Affinität aller Proteinmonomere gegenüber Riboflavin. Weiter wurde ein mittleres Molekulargewicht von 50 kDa angenommen, wodurch die kleineren Untereinheiten unterrepräsentiert sind. Darüber hinaus ist auch die Volumenabschätzung von $9,96 \mu\text{m}^3$ (EIBEL et al., 2000) nur eine grobe Näherung und stellt nur

einen gemittelten Wert dar. Die *in situ*-Besetzungszahl eines Proteinkristalls der Mutante *C171* beträgt 10^6 Moleküle (basierend auf der Annahme von mindestens 3×10^{-7} M Flavin in der Sporangiphore, DOHRMANN, 1983). COLOMBETTI & LENCI (1979) errechneten für den Paraflagellarkörper von *Euglena gracilis* den gleichen Wert. Das ungefähre Volumen des als kubisch angenommenen, etwa $500 \times 500 \times 750$ nm großen Paraflagellarkörpers (OMODEO, 1979) liegt bei $0,19 \mu\text{m}^3$. Die Flavinbeladung des Paraflagellarkörpers scheint daher 50-fach größer zu sein als die eines Kristalls in *Phycomyces blakesleeanus*. Dieser Unterschied in der Besetzungszahl kann auf eine größere Dichte des Paraflagellarkörpers zurückgeführt werden. Eine Erklärung hierfür besteht in einer dichteren Kugelpackung im Paraflagellarkörper gegenüber dem Kristall. Aufgrund der Zunahme der Bindungsstellen pro Kristall um 3×10^7 nach Reduktion ist eine Konformationsänderung der Kristallproteine durch Reduktion bzw. Oxidation denkbar.

Veränderungen hinsichtlich der Form oder Desintegration der Kristalle konnten während der Isolierung, den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen und den Bindungsstudien anhand mikroskopischer Kontrollen nicht festgestellt werden.

5.3 Dichte der oktaedrischen Proteinkristalle

Die oktaedrischen Proteinkristalle der Mutante *C171* lassen sich aufgrund ihrer Dichte in zwei Gruppen unterscheiden. Eine Gruppe mit einer Dichte von $1,247 \text{ g/cm}^3$ und eine Gruppe mit einer Dichte von $1,271 \text{ g/cm}^3$. Diese Werte resultieren aus einem gegenüber ersten Untersuchungen stärker gespreiteten Gradienten. Zunächst wurde eine Dichte der Kristalle von $1,26 \text{ g/cm}^3$ erhalten. Dieser Betrag stellt den Mittelwert dar. Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den aus intrazellulärer Zentrifugation von Sporangiphoren erhaltenen Dichten von $1,1 \text{ g/cm}^3$ und $1,77 \text{ g/cm}^3$ (ZALOKAR, 1969). In keiner der eigenen Zentrifugationsuntersuchungen mit bereits vorgereinigten Kristallen konnten diese Werte bestätigt werden. Möglicherweise wurden die großen Unterschiede durch Interaktion mit anderen Zellbestandteilen verursacht.

Da die Summe der Fluoreszenzemission für pterin- und flavinartige Pigmente nicht mit der Dichte korreliert, besteht kein Zusammenhang zwischen zunehmender Chromophorenbeladung und erhöhter Dichte der Kristalle. Daraus folgt, dass die Unterschiede in der Dichte eine Eigenschaft der Proteinkristalle selbst sind. Allerdings lassen sich in der mikroskopischen Kontrolle keine Unterschiede in der Form oder Oberfläche feststellen. Ebenso sind diese

Unterschiede nicht auf Einzelkristalle oder Kristallcluster, die gelegentlich zu beobachten sind, zurückzuführen.

Die Dichten der beiden Kristallgruppen differieren um 2%. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Kristalle in der Vakuole der Sporangiphoren lokalisiert sind. Die Vakuolenflüssigkeit besitzt eine Dichte von 1,05 g/cm³. Nach dem Archimedischen Prinzip verändern sich die relativen Unterschiede der beiden Kristallgruppen. ($\rho_{\text{Kristalle I}} - \rho_{\text{Vakuole}} = 1,247 - 1,05 = 0,197$) und ($\rho_{\text{Kristalle II}} - \rho_{\text{Vakuole}} = 1,271 - 1,05 = 0,221$). Der relative Dichteunterschied beträgt unter diesen Bedingungen 25%. Anhand von Dosis-Effekt-Kurven des Stammes *C171* und der kristalllosen Mutante *C2* für den Gravitropismus (GALLAND et al., 2004) scheint dieser Betrag jedoch zu gering zu sein, um in der Signaltransduktion des Gravitropismus wirksam und von der Sporangiphore wahrgenommen zu werden.

Eine Signalvermittlung der Kristalle durch Dichteänderung aufgrund unterschiedlicher Chromophorenbeladung und eine damit verbundene mögliche differenzielle Druckverteilung scheint unwahrscheinlich. Da *C2* im Gravitropismus nicht vollkommen defekt ist, müssen ausser den Kristallen andere Gravisuszeptoren wie die Lipidglobuli (SCHIMEK et al., 1999b und GROLIG et al., 2003) angenommen werden.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen zur Chromophorenbeladung stehen dazu nicht im Widerspruch, sondern deuten vielmehr auf eine Kombination verschiedener Reaktionsmechanismen, wie Sedimentation, Redox- und physikochemischer Prozesse und damit auf eine Integration von photo- und gravitropischen Reizen hin.

5.4 Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie

Durch die Bindungsexperimente konnte gezeigt werden, dass flavin- und pterinartige Pigmente an die Proteinkristalle von *Phycomyces blakesleeana* binden, wodurch aus der Fluoreszenzspektroskopie erhaltenen Befunde erhärtet werden. Da Pterine ebenso wie Flavine im Blau beziehungsweise UV-A absorbieren, wird die Funktion der Pterine als akzessorische Pigmente der Flavine diskutiert (GALLAND & SENGER, 1988b, GALLAND et al., 1990, SCHMIDT et al., 1990, KIEWISCH & FUKSHANSKY, 1991 und HOHL et al., 1992a). Ihre Funktion besteht danach in der Erweiterung des Absorptionsspektrums der Flavine und in der Rolle als Photorezeptor oder Redoxpartner für die Flavine und möglicherweise anderer Komponenten der Signaltransduktionskette. Pterine können somit als Verstärker in der

Signaltransduktion dienen (HOHL et al., 1992a). Eine Voraussetzung dafür wäre eine effiziente Energieübertragung zwischen den einzelnen Elementen. Dies wiederum bedeutet eine Bindung beider Partner in oder an eine Matrix, um durch geeignete sterische Anordnung diese Reaktionsabläufe zu gewährleisten.

Um zu überprüfen, ob diese Bedingungen im Falle der Proteinkristalle von *Phycomyces blakesleeanus* vorliegen, ist die Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie ein wichtiges Hilfsmittel. Polarisation ist nur dann detektierbar, wenn die Chromophoren anisotrop verteilt sind. Liegen sie isotrop verteilt vor, beispielsweise in einer wässrigen Lösung, so resultiert aus ihrer in alle Richtungen gleichmässigen Ausrichtung ein wellenlängenunabhängiger Wert p für die Polarisation nahe Null (SCHMIDT, 2000).

Die Polarisationsspektren der oktaedrischen Kristalle des Wildtyps *NRRL1555* und der Mutante *C171* zeigen mit ihren deutlich von Null abweichenden Werten starke Polarisation. Dies bedeutet, dass die Chromophoren an die Proteinkristalle gebunden sind und bestätigt die eigenen Ergebnissen aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen und den Bindungsstudien wie auch frühere Hinweise. EIBEL (1997) und EIBEL et al. (2000) deuteten die Beobachtungen, dass flavinartige Fluoreszenz erst nach Oxidation im Überstand der zentrifugierten Kristalle zu finden sind, dahingehend, dass Chromophore in teilweise oder vollständig reduziertem Zustand an die Proteinkristalle gebunden seien.

Die Polarisationsspektren zeigen klar, dass neben den flavin- auch pterinartige Chromophore an die Kristalle gebunden sind. Würde nur eine Chromophore, beispielsweise ein Flavin vorhanden sein, resultierte daraus ein Polarisationsspektrum mit zwei Plateaus bei 370 und 470 nm. Das Plateau bei 370 nm entspricht dem Übergang der Anregungszustände $S_0 \rightarrow S_2$, wogegen das Plateau bei 470 nm den Übergang $S_0 \rightarrow S_1$ repräsentiert (SCHMIDT, 1980 und SCHMIDT, 2000). Das Plateau bei 340 nm dagegen entspricht einem pterinartigen Pigment.

Die parallele Verschiebung der Polarisationsspektren von Wildtyp und Mutante deutet darauf hin, dass bei den isolierten Kristallen des Wildtyp insgesamt weniger Chromophore gebunden vorliegen. Dies deckt sich auch mit den Resultaten aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen. Die „Ausbeute“ an Chromophoren war beim Wildtyp geringer als bei der Mutante *C171*. Auch die größere Unschärfe des Polarisationsspektrums der Proteinkristalle des Wildtyps *NRRL1555* steht mit den bisher gemachten Beobachtungen im Einklang und ist daher auf quantitative Unterschiede in der Chromophorenbesetzung der Kristalle gegenüber der Mutante zurückzuführen. Da sich die beiden Verläufe sehr ähneln, spricht dies für eine weitgehend übereinstimmende Chromophorenzusammensetzung bei der Mutante und beim Wildtyp. Dies kann aber so nur mit Vorbehalt festgestellt werden, da unter den in dieser Arbeit

besprochenen Untersuchungsbedingungen nicht mit letzter Konsequenz sichergestellt werden konnte, dass alle *in vivo* vorhandenen und mit Kristallen möglicherweise assoziierten chromophoren Gruppen nachgewiesen und charakterisiert werden können.

Der Wert der Polarisierung bei 340 nm, welcher auf ein gebundenes pterinartiges Pigment zurückzuführen ist, gleicht dem Wert bei 470 nm, der von einer gebundenen flavinartigen Chromophore herrührt. Dies ist von überaus wichtiger Bedeutung für eine Signalweiterleitung zwischen den chromophoren Gruppen. Je weniger die Polarisationswerte differieren, um so kleiner ist der Winkel, den die entsprechenden Übergangsdipolmomente zueinander bilden (SCHMIDT, 2000). Daraus resultiert eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für eine Energieübertragung zwischen zwei Molekülen nach dem Modell des Förstertransfers (SCHMIDT, 2000). Darüberhinaus müssen sich das Emissionsspektrum der Energie abgebenden, im kürzerwelligen Spektralbereich absorbierenden Spezies und das Absorptionsspektrum der Energie aufnehmenden, längerwellig absorbierenden chromophoren Gruppe überlagern (SINESHCHEKOV et al., 1994, SCHMIDT, 2000). Aus den nahezu übereinstimmenden Polarisationswerten bei 340 nm und 470 nm lässt sich daher ableiten, dass die Übergangsdipolmomente für den Übergang $S_0 \rightarrow S_1$ der pterin- und flavinartigen Chromophore in fast paralleler Ausrichtung zueinander orientiert sind. Dies ist eine Voraussetzung für Energietransfer.

Die genaue Natur der pterinartigen Chromophore kann an dieser Stelle noch nicht geklärt werden. Ihr Emissionsspektrum stimmt aber sehr gut mit dem Emissionsspektrum der Vergleichssubstanz L-Monapterin mit einem Maximum bei 440 nm überein. Durch die Überlagerung dieses Emissionsspektrums mit dem Blaubereich des Absorptionsspektrums eines flavinartigen Pigmentes ist eine weitere wichtige Bedingung für einen Energietransfer erfüllt. SINESHCHEKOV et al. (1994) konnten mit Hilfe von Fluoreszenzpolarisation zeigen, dass aufgrund der fluorezenzspektroskopischen Charakteristika der pterin- und flavinartigen Chromophoren des Paraflagellarkörpers von *Euglena gracilis* (BRODHUN & HÄDER, 1990, GALLAND et al, 1990 und SCHMIDT et al, 1990) ein Energietransfer zwischen diesen Chromophoren und einer weiteren chromophoren Gruppe möglich erscheint. Energietransfer von Pterinen auf Flavine wurde von CHANDERKAR & SCHUMAN JORNS (1991) für die DNA-Photolyase von *Escherichia coli* gezeigt. Die eigenen Befunde bei *Phycomyces blakesleeanus* stehen damit in Einklang. Gestützt werden diese ebenfalls von Untersuchungen an der DNA-Photolyase von *Escherichia coli*, nach denen 5,10-methenyltetrahydrofolat Energie auf $FADH_2$ überträgt (HAMM-ALVAREZ, 1990, KIM et al., 1991 und KIM et al., 1993).

Neben den Plateaus, die flavin- und pterinartigen Chromophoren zugeordnet werden können, muß auch jenes bei 425-447 nm berücksichtigt werden. Es zeigt leicht geringere Polarisationswerte als das einer pterinartigen Chromophore zuzuordnende Plateau. Die Natur der chromophoren Gruppe, auf die jenes Plateau bezogen werden kann, ist im Augenblick noch unklar. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine weitere pterinartige Chromophore. HOHL et al.(1992a) ordneten den Retentionspeak aus HPLC-Analysen aufgrund der Fluoreszenzanregung bei 430 nm und Emission bei 540 nm Sepiapterin zu. Eine weitere pterinartige Komponente in Assoziation mit den oktaedrischen Proteinkristallen ist daher nicht auszuschließen und kann mit diesen Hinweisen in Übereinstimmung gebracht werden. Eine Energieübertragung von einer pterinartigen Chromophore auf eine noch unbekannte Komponente oder von dieser auf ein flavinartiges Pigment erscheint ebenfalls möglich und steht zu den bisherigen Ergebnissen nicht im Widerspruch.

Die Assoziation mit Flavinen in ihrer Semichinonform wurde bereits diskutiert (EIBEL et al., 2000) und kommt ebenso in Betracht. SCHMIDT & GALLAND (1999) konnten an *Phycomyces blakesleeanus* sogenannte LIACs nachweisen. Diese „light induced absorbance changes“ weisen auf im Rot absorbierende Flavosemichinone hin. Die eigenen Befunde über die Bindung der flavinartigen Chromophore an den Kristall in ihrer reduzierten oder zumindest teilreduzierten Form wie auch die Absorption von Kristallen oberhalb 500 nm stehen damit im Einklang.

Daneben werden auch reduzierte Cytochrome diskutiert, welche durch ein deutliches Maximum bei 420 nm in den Untersuchungen von SCHMIDT & GALLAND (2000) zu schwerkraft-induzierten Absorptionsänderungen bei *Phycomyces blakesleeanus* repräsentiert werden. Sie konnten diese GIACs (gravity induced absorbance changes) nur im Bereich der Wachstumszone der Sporangiphore von *Phycomyces blakesleeanus* nachweisen, wogegen sie außerhalb dieser Zone nicht feststellbar waren. Die Lokalisierung der Kristalle ist nicht auf die Wachstumszone beschränkt (SCHIMEK, 1999 a). Nach SCHMIDT & GALLAND (2000) schließt dies aber dennoch nicht die Möglichkeit aus, dass der Stimulus für die gravitrope Beugung außerhalb der Wachstumszone wahrgenommen und das Signal dann vom Ort der Wahrnehmung zur Wachstumszone weitergeleitet wird.

Die Assoziation der oktaedrischen Proteinkristalle mit pterin- und flavinartigen Chromophoren, beziehungsweise Flavosemichinonen und möglicherweise auch Calcium als Komponenten der Signalweiterleitung steht im Einklang mit der Hypothese von SCHMIDT & GALLAND (2000), nach der die LIACs (SCHMIDT & GALLAND, 1999) und GIACs am Ort des differentiellen Wachstums beobachtet werden können, nicht jedoch außerhalb dieser Wachstumszone. Beiden

Prozessen gemeinsam ist die Signalweiterleitung über Redoxpartner (SCHMIDT & GALLAND, 2000). Dies ist nach den bisherigen Befunden auf die Kristalle übertragbar.

HOHL et al.(1992a) und HOHL et al.(1992b) diskutierten eine reduzierte Lichtsensitivität und einen veränderten Schwellenwert des photogravitropischen Gleichgewichts in Verbindung mit der Reduktion von Pterinen und Flavinen. Pterine und ihre Kombination mit Flavinen stellen eine Voraussetzung für die Photorezeption dar und führen zu einer Modulation und Verstärkung der photogravitropischen Signaltransduktionskette (HOHL et al., 1992a). Die kristalllose und im Gravitropismus defekte Mutante *C213* (EIBEL, 1997, Schimek et al., 1999a und Schimek et al., 1999b) besitzt eine verminderte phototropische Sensitivität gegenüber dem Stamm *C171*, was wahrscheinlich auf das Fehlen der oktaedrischen Kristalle zurückzuführen ist (EIBEL, 1997, GROLIG et al., 2000).

5.5 Rolle der oktaedrischen Kristalle im Gravitropismus

Der Vergleich der vier Stämme *MR14*, *MR18*, *MR74* und *MR77*, die aus der Kreuzung der Stämme *A56* und *C2* hervorgingen und von denen angenommen wird, dass sie isogen seien (MEIER, 2001), deutet darauf hin, dass die oktaedrischen Proteinkristalle auf die gravitropische Beugung keine stimulierende Wirkung ausüben. Die Mutanten *MR74*, *MR77* und *MR18* verhalten sich auf die in einem Bereich von 1,05 bis 1,41 x g veränderte auf sie einwirkende Beschleunigung gleich.

Bemerkenswerterweise zeigt die carotinfreie, aber Kristalle besitzende Mutante *MR14* eine schwächere gravitrope Beugung, wogegen die carotinhaltigen Stämme *MR74* und *MR77* bezüglich der Kristalle keinen Unterschied zeigen. Die Befunde stehen damit im Einklang mit Ergebnissen von MEIER (2001), wonach zwischen den kristalllosen und den kristalltragenden Stämmen keine klaren Unterschiede in der gravitropen Beugungsreaktion zu erkennen sind.

Während die Versuchsdauer bei MEIER (2001) bei fünf Stunden lag und Zentrifugalbeschleunigungen nur bis zu 0,3 x g berücksichtigt wurden, beträgt die Versuchsdauer der in dieser Arbeit besprochenen Experimente drei Stunden. Dies sollte verhindern, dass die gravitropische Beugung eine Sättigung erfährt und eine differenzierte Betrachtung nicht möglich ist. Außerdem wurde bei MEIER (2001) die Schwerkraft durch Klinostatisierung eliminiert.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten erfolgte keine Klinostatisierung zur Eliminierung der Erdbeschleunigung. Das bedeutet, dass auf die Sporangiothoren eine aus

zwei Komponenten (Erd- und Zentrifugalbeschleunigung) resultierende Beschleunigung einwirkt. Als Konsequenz daraus folgt, dass die Beugungswinkel der negativ gravitropen Sporangioophoren maximal die Größe der Winkel dieser auf sie einwirkenden resultierenden Beschleunigung annehmen können und hier eine Limitierung der gravitropen Beugung besteht und so bereits nach drei Stunden Versuchsdauer eine Art Sättigung erreicht ist. Dies ist daher bei weiteren Experimenten nur durch eine Kürzung der Versuchsdauer oder besser eine Klinostatisierung zu verhindern.

Interessant ist die Beobachtung, dass die Mutante mit der geringsten gravitropen Beugung das stärkste Längenwachstum zeigt. Die anderen drei Stämme *MR18*, *MR74* und *MR77* dagegen verhalten sich sowohl in der gravitropen Beugung als auch im Längenwachstum untereinander gleich. Welchen Einfluss das Vorhandensein der Kristalle auf das Längenwachstum der Sporangioophoren tatsächlich ausübt, kann derzeit noch nicht geklärt werden. Neben den Kristallen können hier durchaus noch andere, bisher unbekannte Faktoren eine Rolle spielen.

Ein weiterer den Gravitropismus beeinflussenden unbekannter Faktor wurde auch von MEIER (2001) angenommen. Es zeichnet sich aus den Kreuzungsexperimenten der vorgenannten Stämme ab, dass sie möglicherweise nicht isogen sind (MEIER, 2001). Vergleichende Untersuchungen ergaben, dass die phänotypisch gleichen Stämme *MR77* und *A56* (Parentalstamm) einerseits (β -Carotin, Kristalle, normaler Gravitropismus) und *MR18* und *C2* (Parentalstamm) andererseits (kein β -Carotin, keine Kristalle, defekt im Gravitropismus) die auch genotypisch als gleich eingeschätzt wurden, untereinander jeweils auffällige Unterschiede im Gravitropismus, völlig unabhängig von den Kristallen, zeigten. Dies wurde dahingehend gedeutet, dass es sich nicht um eine reine Vierfaktorkreuzung (Kreuzungstyp, Gravitropismus, Kristalle, β -Carotin) handelt, sondern ein weiterer bisher unbekannter den Gravitropismus beeinflussenden Faktor zu Tage getreten ist.

Diese und die eigenen Befunde steht in klarem Widerspruch zu Ergebnissen, wonach kristalllose Mutanten von *Phycomyces blakesleeana* eine schwächere gravitropische Beugung zeigen als kristalltragende Stämme (EIBEL, 1997, SCHIMEK et al. 1999a). Diese Widersprüchlichkeiten müssen derzeit dahingehend gewertet werden, dass die oktaedrischen Proteinkristalle im Zusammenspiel mit den beiden anderen Reizeingängen für den Gravitropismus, Lipidglobuli-Auftrieb (GROLIG et al., 2003) und Zellwandbiegung (DENNISON, 1961), eine untergeordnete, ja sogar zu vernachlässigende Rolle spielen.

5.6 Einfluss tonischer Bestrahlung auf die Wirkung der Kristalle

Die Experimente zum Einfluss tonischer Bestrahlung auf die gravitropische Beugung wurden mit den Stämmen *MR14* und *MR18* durchgeführt, die sich nur durch den Besitz von Kristallen unterscheiden (MEIER, 2001). Ein weiteres Mutantenpaar (*MR74* und *MR77*), welches zusätzlich Carotine besitzt (MEIER, 2001), wurde vergleichend untersucht. Die Verwendung der Stämme, von denen angenommen wurde, dass sie isogen sind, ermöglichte spezifischere Aussagen über die Rolle der oktaedrischen Proteinkristalle im gravitropischen Beugungsexperiment unter dem Einfluss tonischer Bestrahlung.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kristalle durchaus unter dem Einfluss tonischer Bestrahlung mit Rotlicht von 612 nm Wellenlänge die gravitropische Beugung modulieren. Ein stimulierender Effekt von tonischem Rotlicht der Wellenlänge 612 nm auf die gravitrope Beugung wurde auch von TRÖSTER (2000) beobachtet.

Dies stützt die Vermutung, dass aufgrund der bis in den Rotbereich ausgezogenen Schulter des Absorptionsspektrums isolierter Kristalle, der mikrospektroskopischen Aufnahmen eines einzelnen Kristalls (EIBEL et al. 2000) und der Tatsache, dass Flavosemichinone Rotlicht absorbieren können (SCHMIDT, 2000) weitere modulierende Komponenten an der Suszeption des gravitropischen Reizes beteiligt sind.

Die gravitrope Beugung ist im Falle des carotinfreien kristalltragenden Stammes *MR14* am stärksten. Nicht nur die relative Beugung, sondern auch die absoluten Beugungswinkel sind bei *MR14* am größten. Bei der niedrigen Intensität von 10^{-8} W/m^2 zeigt lediglich die carotinfreie kristalltragende Mutante eine Förderung der gravitropischen Beugung gegenüber der Dunkelkontrolle. Bei $0,5 \text{ W/m}^2$ dagegen wird die Beugung aller Stämme stimuliert, wiederum aber am stärksten bei *MR14*. Möglicherweise wirkt die relativ hohe Intensität unspezifisch.

Die Ergebnisse sprechen für eine Stimulierung der gravitropischen Beugung unter dem Einfluss tonischer Rotlichtbestrahlung und damit für eine Modulation durch die oktaedrischen Kristalle. Es zeigen sich jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede im Beugungsverhalten bereits zwischen den Kontrollen. Besonders bei einem Vergleich der beiden Rotlichtintensitäten im Falle von *MR14*, während die Beugungswinkel der Kontrollen von *MR18*, *MR74* und *MR77* im Rahmen der Messgenauigkeit als gleich zu bewerten sind. Der Unterschied bei *MR14* kann jedoch im Augenblick nicht geklärt werden.

In siebenstündigen Versuchen von MEIER (2001) traten diese Unterschiede nicht auf, was wegen der längeren Versuchsdauer auf einen Sättigungseffekt hinweisen könnte.

Trotz dieser Eigentümlichkeiten (Messfehler durch die hohe Anzahl von jeweils 120 Sporangiphoren sind zu vernachlässigen) und bei Normierung der Beugungswinkel aller Kontrollen resultiert der stärkste Effekt in der gravitropen Beugung während tonischer Rotlichtbestrahlung bei *MR14*, der carotinfreien kristalltragenden Mutante.

Da Flavosemichinone im Rotbereich absorbieren (SCHMIDT, 2000), lassen sich diese Befunde mit den eigenen fluoreszenzspektroskopischen Ergebnissen und früheren Hinweisen (SCHMIDT & GALLAND, 1999 und EIBEL et al., 2000) in Einklang bringen.

Bezogen auf die Kristalle wurde im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen die gravitrope Beugung während der tonischen Bestrahlung mit phototropisch unwirksamem Licht von 612 nm (GALLAND, 1983) des kristalllosen und β -Carotin-freien Stammes *C2* stärker stimuliert als im Falle des Wildtyps *NRRL1555* (TRÖSTER, 2000).

Bezogen auf β -Carotin scheint diesem aus dem Vergleich der kristalltragenden Stämme *MR14* (kein β -Carotin) und *MR77* (besitzt wie der Wildtyp β -Carotin), von denen bisher Isogenität angenommen wurde, ein hemmender Effekt auf die gravitrope Beugung im tonischen Rotlicht zuzurechnen zu sein.

Da β -Carotin bei der hier untersuchten Wellenlängenbereich nicht absorbiert, ist die Wirkung des tonischen Rotlichtes den Kristallen zuzuordnen, während β -Carotin oder möglicherweise ein weiterer, durch die Kreuzung (MEIER, 2001) in Erscheinung getretener unbekannter Faktor den Gravitropismus zu beeinflussen scheint. Die Wirkungsweise bleibt jedoch unklar.

Die hier beobachteten Unterschiede in der Wirkung tonischen Rotlichtes können klar den oktaedrischen Proteinkristallen zugeordnet werden.

Auch durch diese Befunde gestützt sprechen die bisher vorliegenden Ergebnisse dafür, dass für die Signalverarbeitung des Gravitropismus ein komplexes Verrechnungs- und Modulationssystem unter Mitwirkung der oktaedrischen Proteinkristalle vorhanden zu sein scheint. Es bleibt hier festzuhalten, dass sie als Statolithen eher eine untergeordnete Rolle spielen, aber eine Integration von lichtgesteuerten Reaktionen und der gravitropischen Beugung im Bereich der oktaedrischen Kristalle unterstrichen wird.

5.7 Sequenzvergleiche eines Kristallprotein codierenden Gens

Bisher konnte gezeigt werden, dass die oktaedrischen Proteinkristalle von *Phycomyces blakesleeanus* mit flavin- und pterinartigen Pigmenten über nicht-kovalente Bindungen assoziiert sind. Weiter scheint eine Interaktion mit Calcium als Botenstoff möglich. Mit Hilfe

molekularbiologischer Untersuchungen sollten weitere Hinweise auf die Interaktion der Kristalle mit diesen Reaktionspartnern erbracht werden. Darüber hinaus sollte über mögliche Sequenzidentitäten mit Flavoproteinen anderer Organismen die Funktion der Kristalle in der Signaltransduktion des Photogravitopismus näher geklärt werden.

Aus der denaturierenden SDS-PAGE der isolierten oktaedrischen Proteinkristalle gehen mindestens drei Proteinuntereinheiten hervor, wobei die am stärksten repräsentierte Untereinheit von 55kDa zunächst untersucht wurde. Aus der N-terminalen Sequenzierung, dem Durchmustern der genomischen Bank des Wildtyps *NRRL1555* von *Phycomyces blakesleeanus* mit der abgeleiteten Oligonukleotidsonde und dem Klonieren der erhaltenen DNA-Fragmente konnte eine Nukleinsäuresequenz für die 55kDa-Untereinheit der Proteinkristalle erhalten werden. Die Datenbankrecherche hat jedoch keine Übereinstimmungen mit Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen anderer Organismen ergeben, die eine Assoziation dieser Proteinuntereinheit mit Pterinen und Flavinen belegen, lediglich schwache Sequenzidentität mit in der Phototransduktion von *Bos taurus* involvierten cGMP gesteuerten Kanälen. Diese Übereinstimmung ist die einzige, die stromabwärts des ATG-Startcodons gefunden werden konnte. Darüberhinaus fanden sich stromaufwärts Übereinstimmungen mit einem Calciumbindenden Protein von *Rattus norvegicus*. Ein Hinweis auf eine vakuoläre ATPase aus *Mus musculus* ergab sich aus einer schwachen Übereinstimmung im stromaufwärts liegenden Abschnittes der klonierten Nukleotidsequenz.

Die cGMP gesteuerten Kanäle gehören wie die cAMP modulierten Kanäle zu oberflächenaktivierten Transmembranproteinen (ALBERTS et al., 1990). Ihre Funktion besteht bei Vertebraten in der Weiterleitung der durch Photorezeptoren vermittelten Signale über die Hyperpolarisation von Membranen (CHEN et al., 1994). Diese Kanäle besitzen eine hohe Sensitivität für cytosolisches cGMP und sind permeabel für Ca^{2+} (ZHENG et al., 2002). Neben der vakuolären (H^+)-ATPase aus *Mus musculus* (NISHI et al., 2003) wird von MALMSTRÖM et al., (2000) eine calciumabhängige vakuoläre ATPase in *Brassica oleracea* beschrieben. Darüberhinaus konnte SEGER (2001) Sequenzidentität der 46-kDa-Untereinheit der Proteinkristalle von *Phycomyces blakesleeanus* mit einer ENA1-ATPase. Diese gehört zu den P-Typ-ATPasen und zeigt nahe Verwandtschaft zur (Ca^{2+})-ATPase. JENKINS et al. (1995) diskutieren die Sequenzhomologie zwischen dem für *CRY1* von *Arabidopsis thaliana* codierenden Gen *HY4* und einer für das Tropomyosin codierenden Nukleotidsequenz bei der Ratte. Bei der Muskelkontraktion ist die Aktivierung der Myosin-ATPase calciumreguliert. Nach MALHOTRA et al. (1995) bindet das *HY4*-Protein neben FAD auch Methenyltetrahydrofolat, ein Pterin. Trotz der schwachen Hinweise aus den Recherchen zu Sequenzidentitäten mit der 55-

kDa-Untereinheit besteht die berechtigte Annahme, dass in die Signaltransduktion des Gravitropismus neben der Assoziation der oktaedrischen Proteinkristalle mit Flavinen und Pterinen auch eine Interaktion der Kristalle mit Calcium als Botenstoff involviert ist. Dass bisher keine Sequenzübereinstimmung mit Bindedomänen für Flavine oder Pterine gefunden wurde, bedeutet nicht, dass die Proteinkristalle keine Bindedomänen für Flavine oder Pterine besitzen. Schwierigkeiten bei der Überprüfung auf Sequenzähnlichkeiten können auf die Verwendung einer genomischen DNA-Bibliothek zurückgeführt werden. Das bedeutet, dass Intronabschnitte die Interpretation der Sequenzinformation erschweren, wodurch die nur schwachen Sequenzübereinstimmungen mit kurzen DNA-Abschnitten erklärbar wären. Eine weitere Komplikation kann in der Verwendung einer degenerierten Oligonukleotidsonde gesehen werden, die durch mögliche Fehlpaarungen an den Wobblepositionen auch die Durchmusterung der DNA-Bibliothek beeinflussen.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinkristalle zeigte drei stark repräsentierte Proteinbanden. Dies bedeutet nicht, dass die Proteinkristalle nur aus diesen drei Untereinheiten bestehen. Es erscheint daher möglich, dass weitere bisher nicht identifizierte Proteinuntereinheiten vorhanden sind und möglicherweise die vermuteten Bindedomänen für chromophore Gruppen wie Flavine und Pterine dort lokalisiert sind.

5.8 Expression eines Kristallgens

Ob eine differenzielle Expression der für die Kristallproteine codierende DNA in Abhängigkeit von den Lichtbedingungen während des Wachstums von Myzel und Sporangiphoren stattfindet, kann anhand der vorliegenden ersten Ergebnisse noch nicht beantwortet werden. Sowohl nach der Anzucht unter Rotlicht als auch unter Blaulicht zeigen Sporangiphoren und Myzel das gleiche Expressionsmuster. Selbst die Kontrollen der im Dunkel angezogenen Sporangiphoren und Myzelien beider Stämme, der kristalltragenden Mutante *MR77* und des kristalllosen *MR74*, unterscheiden sich davon nicht.

Die aus der Größe der 55kDa-Untereinheit der Proteinkristalle errechnete Fragmentlänge der codierenden Sequenz hätte ein Hybridisierungssignal bei 1500 Basenpaaren erwarten lassen. Da dieses nicht erhalten werden konnte, sind die Northernblotsignale artifizieller Natur. Der Grund dafür ist möglicherweise im Zusammenhang zu den schwachen Befunden aus den Untersuchungen zu Sequenzidentitäten zu sehen. Trotz der schwachen Hinweise ist eine relativ hohe Unspezifität der Hybridisierungsergebnisse anzunehmen, welche sich in den

Expressionsstudien niederschlägt. Daher lassen sich Aussagen über die Lokalisierung möglicher Kristallproteinvorstufen in verschiedenen Stämmen, den Zeitpunkt ihrer Biosynthese während der Sporangiphorengese und Einflüsse bestimmter Lichtqualitäten darauf nicht treffen. Die Untersuchungen zur differentiellen Expression der Kristallgene, wie auch die Klonierungs- und Sequenzierungsexperimente stellen einen ersten Schritt in dem Versuch dar, die oktaedrischen Proteinkristalle von *Phycomyces blakesleeanus* auf molekularbiologischem Wege zu charakterisieren und wichtige Information über ihre Funktion in der Signalweiterleitung des Photogravitropismus zu erhalten.

5.9 Einfluss von Calcium auf die gravitrope Beugung

Sowohl bei den Versuchen zum Längenwachstum als auch bei den Experimenten zur gravitropen Beugung der Sporangiphoren von *Phycomyces blakesleeanus* haben sich erste Hinweise auf eine Beteiligung der oktaedrischen Proteinkristalle an einer calciumvermittelten Signalweiterleitung ergeben. Es zeichnet sich eine unterschiedliche Beeinflussbarkeit der gravitropischen Beugung durch extern appliziertes Calcium in Abhängigkeit vom Vorhandensein oktaedrischer Kristalle ab. Die Sporangiphoren der kristalltragenden Mutante *MR77* scheinen von Veränderungen der externen Calciumkonzentration in ihrer gravitropischen Beugung weniger stark betroffen zu sein als die kristalllose Mutante *MR74*. Da *MR74* mit größeren Schwankungen in der gravitropischen Beugung reagiert, kann den oktaedrischen Proteinkristalle eine Art Pufferfunktion zugerechnet werden. Diese Pufferfunktion zeichnet sich in den Versuchen zum reinen Längenwachstum nur schwach ab, wozu auch die relativ starke Fehlerstreuung beiträgt. Dagegen wird dies in den Beugungsexperimenten stärker deutlich. Die kristalllose Mutante reagiert offenbar auf wechselnde Calcium-Konzentrationen sensibler mit größeren Schwankungen im gravitropischen Beugungswinkel. Dagegen erfolgt die Beugung des kristalltragenden Stammes mit wesentlich kleineren Schwankungen. Zu beachten ist dabei allerdings, dass die gravitrope Beugung der Sporangiphoren für das Längenwachstum korrigiert ist. Da es sich bei der gravitropen Beugungsreaktion um ein differenzielles Längenwachstum handelt, muss daher das reine Längenwachstum berücksichtigt werden. Zeigt eine Sporangiphore eine starke Längenzunahme, so ist die absolute Beugung ebenfalls stark. Wird dagegen die Beugung zum Längenwachstum in Relation gesetzt, verringert sich das Maß der gravitropischen Beugung. Ausreißer im Längenwachstum ziehen daher auch größere Schwankungen der Beugung in die jeweilige Gegenrichtung nach sich. Der Einfluss von extern

appliziertem Calcium scheint aufgrund dieser Überlegungen indirekt über das Längenwachstum auf die Beugung zu erfolgen. Bemerkenswerterweise beeinflusst jedoch ein künstlich herbeigeführter Calciummangel weder das Längenwachstum noch die gravitropische Beugung. Eine mögliche Ursache könnte in der Speicherfunktion der Vakuole gesehen werden, wodurch Calciummangel ausgeglichen werden kann, wogegen ein Zusatzangebot durchaus Wachstumsprozesse beeinflussen kann. Wie diese Wirkungsweisen genau aussehen, ist im Moment noch unklar. Da aber offenbar ein Unterschied zwischen einem kristalllosen Stamm und einer kristalltragenden Mutante besteht, ist eine Beteiligung der Kristalle an diesen Effekten nicht ausgeschlossen. Multiple Effekte des extern applizierten Calciums sind wahrscheinlich. Dies macht jedoch die klare Eingrenzung einer Calciumwirkung auf die Reaktionsweise der Kristalle außerordentlich schwierig.

Nach den ersten Befunden scheint es möglich, dass oktaedrische Proteinkristalle in der Lage sind, Calcium zu binden. Calcium ist Bestandteil der Zellwand und ein wichtiger Faktor für die Funktion und Integrität von Biomembranen. Damit kommt Calcium auch eine bedeutende Rolle in der Signalvermittlung über Kompartimentgrenzen hinweg zu. Es wird neben weiteren Ionen in der Vakuole aktiv akkumuliert. Die oktaedrischen Kristalle von *Phycomyces blakesleeanus* sind ebenfalls in der Vakuole lokalisiert (SCHIMEK et al. 1999b). Da die Vakuole als Speicherort auch eine Art Pufferfunktion übernimmt, scheint sich dies über die Kristalle auf die gravitropische Beugung auszuwirken. Bei *Nicotiana plumbaginifolia* und *Arabidopsis thaliana* konnte eine durch Blaulicht induzierte Zunahme der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration nachgewiesen werden (BAUM et al., 1999 und BABOURINA et al., 2002). Diese erfolgt bei Wildtyp-Hypokotylen von *Arabidopsis thaliana* sowohl durch Einstrom aus dem Apoplasten als auch aus internen Speichern (BABOURINA et al., 2002). CHO & SPALDING (1996) fanden in *Arabidopsis thaliana* einen Anionenkanal in der Plasmamembran, der durch Blaulicht aktiviert wird. MASIH & MISRA (2001) diskutieren die durch Blaulicht stimulierte Aktivierung einer Ca^{2+} -ATPase, eine damit verbundene Depolarisierung der Plasmamembran und den Calcium-Einstrom in das Cytoplasma von *Cuscuta reflexa*. Nach REYMOND et al. (1992) wird in *Arabidopsis thaliana* ein Membranprotein unter Blaulicht-Einfluss phosphoryliert. BRAATSCH et al. (2002) berichten von einem Flavoprotein in *Rhodobacter sphaeroides*, dass sowohl Blaulicht als auch redoxabhängige Signale in der integriert.

Die Rolle der Kristalle als druckvermittelnde Statolithen tritt nach den vorliegenden Ergebnissen eher in den Hintergrund.

Dennoch ist durch Umverteilung der Kristalle in der Vakuole eine gerichtete Signaltransduktion wahrscheinlich.

So erfolgt die Verlagerung der Statolithen bei *Chara* über eine gerichtete, durch Actinfilamente vermittelte Umverteilung zu spezifischen statolithen-sensitiven Plasmamembran-Bereichen (BRAUN, 2002). Die Signalvermittlung könnte weiter über Membran-Hyperpolarisation (CHEN et al., 1994) oder durch Membranproteine stattfinden, die in Kontakt mit Graviperzeptionsstrukturen treten (SEDBROOK et al., 1999). MORITA et al. (2002) diskutieren ein möglicherweise als Phospholipase wirkendes Protein, das in der Signaltransduktionskette des Gravitropismus bei *Arabidopsis thaliana* involviert und neben den sedimentierenden Amyloplasten in den Vakuolen der Endodermiszellen zu finden ist. Über die Phospholipase wäre die Regulation von Calciumströmen in das Cytosol denkbar (MORITA et al., 2002). Möglich ist auch die Aktivierung Calcium/Calmodulin-abhängiger ATPasen (MALMSTRÖM et al., 2000 und ZHENG et al., 2002).

Die bisher vorliegenden Ergebnisse über die Bindungspartner der Kristalle und die Art der Anordnung der Chromophoren lassen solche Funktionsweisen möglich erscheinen. Die oktaedrischen Kristalle von *Phycomyces blakesleeanus* können so an UV-A/Blau- und Calciumvermittelten Signaltransduktionsprozessen des Photogravitropismus beteiligt sein.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation der oktaedrischen parakristallinen Proteinkörper der Sporangiophore von *Phycomyces blakesleanus* mit chromophoren Gruppen mithilfe fluoreszenzspektroskopischer, physiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden und ihre mögliche Funktion in der Aufnahme und Weiterleitung phototropischer und gravitropischer Umweltsignale untersucht.

- Durch Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie konnte gezeigt werden, dass die oktaedrischen Proteinkristalle reversibel flavin- und pterinartige Pigmente binden und daher als Träger von Flavoproteinen zu klassifizieren sind.
- Die gezielte Behandlung mit Reduktions- und Oxidationsmitteln sowie Bindungsexperimente mit Riboflavin zeigten eine vom Redoxzustand abhängige Bindung der flavinartigen Chromophoren an die Kristalle ($K_D = 6 \times 10^{-5} \text{M}$, oxidiert; $K_D = 2,8 \times 10^{-5} \text{M}$, reduziert). Für die pterinartigen Pigmente kann das Gleiche angenommen werden. Die flavinartigen Chromophoren sind im reduzierten Zustand und die pterinartigen Chromophoren im oxidierten Zustand an die Kristalle gebunden. Eine Elektronenübertragung von pterin- auf flavinartige Chromophoren ist als Teilschritt der Signaltransduktion möglich.
- Aufgrund der Extrahierbarkeit der chromophoren Gruppen mit Methanol und der Sensitivität gegenüber veränderten Redoxbedingungen scheint deren Bindung an die oktaedrischen Kristalle nicht-kovalenter Natur zu sein.
- Durch Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie konnte die Bindung flavin- und pterinartiger Chromophoren an die Proteinmatrix in nahezu paralleler Orientierung zueinander gezeigt werden. Es besteht starke Evidenz für eine strahlungslose Energieübertragung über Förstertransfer von pterin- auf flavinartige Chromophoren.
- Tonisches Rotlicht stimuliert unter dem Einfluss der Kristalle die gravitrope Sporangiophorenbeugung. Aufgrund der Absorptionseigenschaften der an die Kristalle gebundenen Chromophoren ist eine Verrechnung von Photo- und Gravitropismus möglich.
- Aufgrund von Experimenten zur gravitropen Beugung scheint die Funktion der Kristalle als Statolithen für den Gravitropismus im Vergleich zu den weiteren Reizeingängen Zellwandbiegung und Lipidglobuliauftrieb eher von geringer Bedeutung.

- Erste Ergebnisse zur gravitropen Beugung in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration des umgebenden Mediums weisen darauf hin, dass eine kristalltragende Mutante durch Änderungen der Calciumkonzentration weniger beeinträchtigt wird als eine kristallose Mutante. Den Kristallen scheint danach eine Art Pufferfunktion zuzukommen.
- Übereinstimmungen zu schon bekannten Flavoproteinen konnten von Sequenzen der 55kDa-Kristallproteinuntereinheit nicht gefunden werden. Bisher ist es nicht gelungen, durch Untersuchung der Expression der Kristallgene Hinweise darüber zu erhalten, wie die zeitliche und räumliche Verteilung von Vorstufen der Kristallproteine, auch unter Berücksichtigung besonderer Lichtqualitäten, während der Sporangio- oder Sporangiophorogenese aussieht.
- Hinweise über Sequenzähnlichkeiten zu in der Phototransduktion involvierten cGMP-gesteuerten Kanälen, einem calciumbindenden Protein sowie einer vakuolären ATPase stützen jedoch die Vermutung, dass Calcium an die Kristalle bindet und für die Signaltransduktion des Photogravitropismus von Bedeutung ist.

Die Hinweise auf die Energieübertragung zwischen den chromophoren Gruppen, deren Assoziation mit den Kristallen, die Integration von Licht- und Schwerereizen und die mögliche Interaktion über calciumvermittelte Prozesse an und über Membranen hinweg stellen die Basis dar für die weitergehende Aufklärung der besonderen Funktion der oktaedrischen Proteinkristalle in *Phycomyces blakesleeanus*.

7 Literatur

Ahmad, M. & Cashmore, A. R. (1993)

HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor.
Nature 366: 162-166

Ahmad, M. & Cashmore, A. R. (1996)

Seeing blue: the discovery of cryptochrome.
Plant Mol. Biol. 30: 851-861

Ahmad, M., Lin, C. & Cashmore, A. R. (1995)

Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation.
Plant J. 8: 653-658

Ahmad, M., Jarillo, J. A., Smirnova, O. & Cashmore, A. R. (1998)

Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism.
Nature 392: 720-723

Ahmad, M., Grancher, N., Heil, M., Black., R. C., Giovani, B., Galland, P. & Lardemer, D. (2002)

Action spectrum for cryptochrome-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*.
Plant Physiol. 129: 774-785

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1990)

Molekularbiologie der Zelle
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Azuara, M. P. & Aparicio, P. J. (1983)

In vivo blue light activation of *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate reductase.
Plant Physiol. 71: 286-290

Babourina, O., Newman, I. & Shabala, S. (2002)

Blue light-induced kinetics of H^+ and Ca^{2+} fluxes in etiolated wild-type and phototropin-mutant *Arabidopsis* seedlings.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 2433-2438

Baskin, T. I. & Ino, M. (1987)

An action spectrum in the blue and ultraviolet for phototropism in *alfalfa*.
Photochem. Photobiol. 46: 127-136

Batschauer, A. (1993)

A plant gene for photolyase: an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage.
Plant J. 4: 705-709

Baum, G., Long, J. C., Jenkins, G. I. & Trewavas, A. J. (1999)

Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca^{2+}
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13554-13559

Bergman, K., Eslava, A. P., & Cerda-Olmedo, E. (1973)

Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism.
Mol. Gen. Genet. 123: 1-16

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979)

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523

Björkmann, T. (1988)

Perception of gravity by plants.
Adv. Bot. Res. 15: 1-41

Blasco, J. L., Roeßink, D., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P. & Galland, P. (2001)

Photocarotenogenesis in *Phycomyces*: expression of the *carB* gene encoding phytoene dehydrogenase
J. Plant Res. 114: 25-31

Blum, D. E., Neff, M. M. & van Volkenburgh, E. (1994)

Light stimulated cotyledon expansion in *blu3* and *hy4* mutants of *Arabidopsis thaliana*.
Plant Physiol. 105: 1433-1436

Blum, H., Beier, H. & Gross, H. (1987)

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.
Electrophoresis 8 : 93-99

Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S. & Klug, G. (2002)

A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*.
Molecular Microbiology 45: 827-836

Braun, M. (2002)

Gravity perception requires statoliths settled on specific plasma membrane areas in characean rhizoids and protonemata.
Protoplasma 219: 150-159

Braun, M. & Sievers, A. (1994)

Role of the microtubule cytoskeleton in gravisensing *Chara* rhizoids.
Eur. J. Cell. Biol. 63: 289-298

Brodhun, B. & Häder, D.-P. (1990)

Photoreceptor proteins and pigments in the paraflagellar body of the flagellate *Euglena gracilis*.
Photochem. Photobiol. 52: 876-881

Brown, G. M., Primus, J. P. & Switchenko, A. C. (1986)

Biosynthesis of tetrahydrobiopterin and related compounds in *Drosophila melanogaster*.
In: Chemistry and biology of pteridines 1986 (Cooper, B. A. & Whitehead, V. M., Hrsg.) 125-139, Walter de Gruyter, Berlin

Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., Tainer, J. A. & Getzoff, E. D. (2003)

Identification of a new cryptochrome class. Structure, function and evolution.
Mol. Cell. 11: 59-67

Campuzano, V., Galland, P., Alvarez, M. I. & Eslava, A. P. (1996)

Blue-light receptor requirement for gravitropism, autochemotropism and ethylene response in *Phycomyces*.
Photochem. Photobiol. 63: 686-694

Cerdá-Olmedo, E. & Lipson, E. D. (1987)

A biography of *Phycomyces*
In: *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo, E. & Lipson, E. D., Hrsg.)
Cold Spring Harbour Laboratory

Chanderkar, L. P. & Schuman Jorns, M. (1991)

Effect of flavin structure and redox state on catalysis by and flavin-pterin energy transfer in *Escherichia coli* DNA photolyase.
Biochemistry 30: 745-754

Chen, X. Y., Xiong, Y. Q., Lipson, E. D. (1993)

Actionspectrum for subliminal light control of adaptation in *Phycomyces* phototropism.
Photochem. Photobiol. 58: 425-431

Chen, T. Y., Illing, M., Molday, L. L., Hsu, Y. T., Yau, K. W. & Molday, R. S. (1994)

Subunit2 (or β) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca^{2+} -calmodulin modulation.
Neurobiology 91: 11757-11761

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. (1979)

Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.
Biochemistry 18: 5294-5299

Cho, M. H. & Spalding, E. P. (1996)

An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8134-8138

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem. 162: 156-159

- Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A. A., Liscum, E. & Briggs, W. R. (1998)**
Arabidopsis NPH1: A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism.
Science 282: 1698-1701
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. & Briggs, W. R. (1999)**
LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8779-8783
- Church, G. M. & Gilbert, W. (1984)**
Genomic sequencing.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991-1995
- Cohen, R. J., Jan, Y. N., Matricon, J. & Delbrück, M. (1975)**
Avoidance response, house response, and wind response of the sporangiophore of *Phycomyces*.
J. Gen. Physiol. 66: 67-95
- Colombetti, G. & Lenci, F. (1980)**
Identification and spectroscopic characterization of photoreceptor pigments.
In: Photoreception and sensory transduction in aneural organisms
NATO ASI Series (Lenci, F. and Colombetti, G., Hrsg.) 173-188, Plenum Press, New York, London
- Demerec, M., Adelberg, E. A., Clark, A. J. & Hartman, P. E. (1966)**
A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics.
Genetics 54: 61-76
- Dennison, D. S. (1961)**
Tropic responses of *Phycomyces* sporangiophores to gravitational and centrifugal stimuli.
J. Gen. Physiol. 45: 23-38
- Dennison, D. S. (1964)**
The effect of light on the geotropic responses of *Phycomyces* sporangiophores.
J. Gen. Physiol. 47: 651-665
- Dennison, D.S. & Roth, C.C. (1967)**
Phycomyces sporangiophores: fungal stretch receptors.
Science 156: 1386-1388
- Dennison, D. S. & Shroshire, W., Jr. (1984)**
The gravireceptor of *Phycomyces*: its development following gravity exposure.
J. Gen. Physiol. 84: 854-859
- Devlin, P. F. & Kay, S. A. (2000)**
Cryptochromes are required for phytophormone signaling to the circadian clock but not for rhythmicity.
Plant Cell 12: 2499-2510
- Dohrmann, U. (1983)**
In-vitro riboflavin binding and endogenous flavins in *Phycomyces blakesleeana*.
Planta 159: 357-365
- Eckert, W. A. & Kartenbeck, J. (1997)**
Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Eibel, P. (1997)**
Charakterisierung oktaedrischer Kristalle in *Phycomyces blakesleeana*.
Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg
- Eibel, P., Schimek, C., Fries, V., Grolig, F., Schapat, T., Schmidt, W., Schneckenburger, H., Ootaki, T., & Galland, P. (2000)**
Statoliths in *Phycomyces*: Characterization of octahedral protein crystals.
Fungal Gen. Biol. 29: 211-220
- Emery, P., Stanewsky, R., Hall, J. C. & Rosbash, M. (2000)**
A unique circadian photoreceptor.
Nature 404: 456-457

- Ensminger, P. A., Chen, X. & Lipson, E. D. (1990)**
Action spectra of photogravitropism of *Phycomyces* wild type and three behavioral mutants (L150, L152, L154).
Photochem. Photobiol. 51: 681-687
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1984)**
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Addendum. Anal. Biochem. 137: 266-267
- Flores, R., Dederichs, A., Cerdá-Olmedo, E. & Hertel, R. (1999)**
Flavin-binding sites in *Phycomyces*.
Plant Biol. 1: 645-655
- Fries, V., Krockert, T., Grolig, F. & Galland, P. (2002)**
Statoliths in *Phycomyces*: spectrofluorometric characterization of octahedral protein crystals.
J. Plant Physiol. 159: 39-47
- Fu, Z., Inaba, M., Noguchi, T. & Kato, H. (2002)**
Molecular cloning and circadian regulation of cryptochrome genes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).
J. Biol. Rhythms 17: 14-27
- Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Kato, T., Fujisawa, H., Benfey, P. N. & Tasaka, M. (1998)**
Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*.
Plant J. 14: 425-430
- Fuller, R. C. & Nugent, N. A. (1969)**
Pteridines and the function of the photosynthetic reaction center.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63: 1311-1318
- Fuller, R. C., Kidder, G. W., Nugent, N. A., Dewey, V. C. & Rigopoulos, N. (1971)**
The association and activities of pteridines in photosynthetic systems.
Photochem. Photobiol. 14: 359-371
- Galland, P. (1983)**
Action spectra of photogeotropic equilibrium in *Phycomyces* wild type and three behavioral mutants.
Photochem. Photobiol. 37: 221-228
- Galland, P. (1990)**
Phototropism of the *Phycomyces* sporangiophore: a comparison with higher plants.
Photochem. Photobiol. 52: 233-248
- Galland, P. (1992)**
Forty years of blue-light research and no anniversary.
Photochem. Photobiol. 56: 847-853
- Galland, P. (1998)**
Reception of far-ultraviolet light in *Phycomyces*: antagonistic interaction with blue and red light.
Planta 205: 269-276
- Galland, P. & Lipson, E. D. (1985a)**
Action spectra for phototropic balance in *Phycomyces blakesleeana*: dependence on reference wavelength and intensity range.
Photochem. Photobiol. 41: 323-329
- Galland, P. & Lipson, E. D. (1985b)**
Modified action spectra for photogeotropic equilibrium in *Phycomyces blakesleeana* mutants with defects in genes *madA*, *madB*, *madC* and *madH*.
Photochem. Photobiol. 41: 331-335
- Galland, P. & Lipson, E. D. (1987)**
Blue-light reception in *Phycomyces* phototropism: evidence for two photosystems operating in low- and high-intensity ranges.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 104-108
- Galland, P. & Senger, H. (1988a)**
New trends in photobiology (Invited review) - The role of flavins as photoreceptors.
J. Photochem. Photobiol. B1: 277-294

Galland, P. & Senger, H. (1988b)

The role of pterins in the photoreception and metabolism of plants.
Photochem. Photobiol. 48: 811-820

Galland, P. & Senger, H. (1991)

Flavins as possible blue light photoreceptors.
In: Photoreceptor evolution and function (Holmes, M. G., Hrsg.)
Academic Press, San Diego, 65-124

Galland, P. & Tölle, N. (2003)

Light-induced fluorescence changes in *Phycomyces*: evidence for blue light-receptor associated flavo-semiquinones.
Planta 217: 971-982

Galland, P., Pandya, A. & Lipson, E. D. (1984)

Wavelength dependence of dark adaptation in *Phycomyces* phototropism.
J. Gen. Physiol. 84: 739-751

Galland, P., Orejas, M. & Lipson, E. D. (1989)

Light-controlled adaptation kinetics in *Phycomyces*: evidence for a novel yellow-light absorbing pigment.
Photochem. Photobiol. 49: 493-500

Galland, P., Finger, H. & Wallacher, Y. (2004)

Gravitropism in *Phycomyces*: Threshold determination on a clinostat centrifuge.
J. Plant Physiol., in press

Galland, P., Keiner, P., Dörnemann, D., Senger, H., Brodhun, B. & Häder, D.-P. (1990)

Pterin- and flavin-like fluorescence associated with isolated flagella of *Euglena gracilis*.
Photochem. Photobiol. 51: 675-680

Galland, P., Wallacher, Y., Finger, H., Hannapel, M., Tröster, S., Bold, E. & Grolig, F. (2001)

Tropisms in *Phycomyces*: sine law for gravitropism, exponential law for photogravitropic equilibrium.
Planta 214: 931-938

Gichner, T. & Veleminsky, J. (1982)

Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs
Mutation Research 99: 129-242

Grolig, F., Eibel, P., Schimek, C., Schapat, T., Dennison, D. S. & Galland, P. (2000)

Interaction between gravitropism and phototropism in sporangiophores of *Phycomyces blakesleeana*.
Plant Phys. 123: 765-776

Grolig, F., Herkenrath, H., Pumm, T., Gross, A. & Galland, P. (2003)

Gravity susception by buoyancy: floating lipid globules in sporangiophores of *Phycomyces*.
Planta, online-article

Guo, H., Yang, W. Y., Mockler, T. C. & Lin, C. T. (1998)

Regulations of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors.
Science 279: 1360-1363

Gutiérrez-Corona, F. & Cerdá-Olmedo, E. (1985)

Environmental influences in the development of *Phycomyces* sporangiophores.
Exp. Mycol. 9: 56-63

Hamm-Alvarez, S., Aziz Sancar, A. & Rajagopalan, K. V. (1990)

The folate cofactor of *Escherichia coli* DNA photolyase acts catalytically.
J. Biol. Chem. 265: 18656-18662

Hertel, R., Jesaitis, A. J., Dohrmann, U. & Briggs, W. R. (1980)

In vitro binding of riboflavin to subcellular particles from maize coleoptiles and *Cucurbita* hypocotyls.
Planta 147: 312-319

Hirose, F. & Takano, M. (2003)

Rice cryptochrome 2 gene.
AB103094

Hoffman, P. D., Batschauer, A & Hays, J. B. (1996)

PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to blue-light photoreceptors and microbial photolyases.
Mol. Gen. Genet. 253: 259-265

Hohl, N. A. (1992)

Analyse von Pterinen und Flavinen in Wildtyp und Verhaltensmutanten von *Phycomyces blakesleeanus*.
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

Hohl, N., Galland, P. & Senger, H. (1992a)

Altered pterin patterns in photobehavioral mutants of *Phycomyces blakesleeanus*.
Photochem. Photobiol. 55: 239-245

Hohl, N., Galland, P. & Senger, H. (1992b)

Altered flavin patterns in photobehavioral mutants of *Phycomyces blakesleeanus*.
Photochem. Photobiol. 55: 247-255

Horie, T., Schimek, C. & Ootaki, T. (1998)

Gravitropic responses of *Phycomyces* and *Pilobolus* sporangiophores and possible mode of action.
6th International Mycological Congress, Jerusalem, Israel, Abstract: 103

Hsu, D. S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R. P., Todo, T., Wei, Y. F. & Sancar, A. (1996)

Putative human blue-light photoreceptors hCry1 and hCry2 are flavoproteins.
Biochemistry 35: 13871-13877

Imaizumi, T., Kadota, A., Hasebe, M & Wada, M. (2002)

Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*.
Plant Cell 14: 373-386

Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M.,

Takahashi, T., Hori, T. & Watanabe, M. (2002)
A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*.
Nature 415: 1047-1051

Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J. M., Benito, E. P., Alvarez, M. I. & Eslava, A. P. (1992)

Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakesleeanus leu1* gene.
Curr. Genet. 21: 215-223

Jackson, J.A. & Jenkins, G. I. (1995)

Extension-growth response and expression of flavonoid biosynthesis genes in the *Arabidopsis hy4* mutant.
Planta 197: 233-239

Jenkins, G. I., Christie, J. M., Fuglevand, G., Long, J. C. & Jackson, J. A. (1995)

Plant responses to UV and blue light: biochemical and genetic approaches.
Plant Science 112: 117-138

Johnson, J. L., Hamm-Alvarez, S., Payne, G., Sancar, G. B., Rajagopalan, K. V. & Sancar, A. (1988)

Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2046-2050

Jorns, M. S., Wang, S. B. & Jordan, S. P. (1987)

DNA repair catalyzed by *Escherichia coli* DNA photolyase containing only reduced flavin: elimination of the enzyme's second chromophore by reduction with sodium borohydride.
Biochemistry 26: 6810-6816

Jorns, M. S., Wang, S. B. & Jordan, S. P., Chanderkar, L. P. (1990)

Chromophore function and interaction in *Escherichia coli* DNA photolyase: reconstitution of the apoenzyme with pterin and / or flavin derivatives.
Biochemistry 29: 552-561

Kanegae, T. & Wada, M. (1998)

Isolation and characterization of homologues of plant blue-light photoreceptor (cryptochrome) genes from the fern *Adiantum capillus-veneris*.
Mol. Gen. Genet. 259: 345-353

Kendrick, B. (1992)

The fifth kingdom.
Focus Information Group, Newburyport, USA

Kern, V. D. & Hock, B. (1996)

Gravitropismus bei Pilzen.
Naturw. Rdsch. 49: 174-180

Kiewisch, S. & Fukshansky, L. (1991)

Detection of pterins in *Phycomyces* sporangiophores.
Photochem. Photobiol. 53: 407-409

Kim, S.T., Sancar, A., Essenmacher, C. & Babcock, G. T. (1993)

Time-resolved EPR studies with DNA photolyase: Excited-state FADH⁰ abstracts an electron from Trp-306 to generate FADH⁻, the catalytically active form of the cofactor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90: 8023-8057

Kim, S.T., Heelis, P. F., Okamura, T., Hirata, Y., Mataga, N. & Sancar, A. (1991)

Determination of rates and yields of interchromophore (folate - flavin) energy transfer and intermolecular (flavin - DNA) electron transfer in *Escherichia coli* photolyase by time-resolved fluorescence and absorption spectroscopy.
Biochemistry 30: 11262-11270

Kiss, J. Z., Hertel, R. & Sack, F. R. (1989)

Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in root of *Arabidopsis thaliana*.
Planta 177: 198-206

Klenow, H. & Henningsen, I. (1970)

Selective elimination of the exonuclease activity of the desoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* by limited proteolysis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65: 168-175

Klemm, E. & Ninnemann, H. (1979)

Nitrate reductase – a key enzyme in blue light-promoted conidiation and absorbance change in *Neurospora*.
Photochem. Photobiol. 29: 629-632

Kobayashi, Y., Kanno, S., Smit, B., van der Horst, G T., Takao, M. & Yasui, A. (1998a)

Molecular characterization of a gene encoding a photolyase from *Streptomyces griseus*.
Nucleic Acids Res. 17: 4731-4744

Kobayashi, Y., Kanno, S., Smit, B., van der Horst, G T., Takao, M. & Yasui, A. (1998b)

Characterization of photolyase / blue-light receptor homologues in mouse and human cells.
Nucleic Acids Res. 26: 5086-5092

Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., Fukuda, I., Tsujimura, T., Terada, N., Kamaei, Y., Yuba, S., Iwai, S. & Todo, T. (2000)

Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish.
Genes Cells 5: 725-738

Koorneef, M., Rolff, E. & Spruit, C. J. P. (1980)

Genetic control of light induced hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
Z. Pflanzenphysiol. 100: 147-160

Koorneef, M., Hanhart, C. J. & van der Veen, J. H. (1991)

A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*.
Mol. Gen. Genet. 229: 57-66

Laemmli, U. K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.
Nature (London) 227: 680-685

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. & Boedtker, H. (1977)

RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination.
Biochemistry 16: 4743-4751

Libbert, E. (1987)

Lehrbuch der Pflanzenphysiologie
Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart Jena New York

Lin, C. (2000)

Plant blue-light receptors.
Trends Plant Sci. 5: 337-342

Lin, C., Ahmad, M., Gordon, D & Cashmore, A. R. (1995a)

Expression of an *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A and green light.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8423-8427

Lin, C., Robertson, D. E., Ahmad, M., Rabeibekas, A. A., Jorns, M. S., Dutton, P. L. & Cashmore, A. R. (1995b)

Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light-receptor CRY1.
Science 269: 968-970

Lin, C., Ahmad, M., Chan, J. & Cashmore, A. R. (1996)

CRY2: a second member of the *Arabidopsis* cryptochrome gene family (accession No. U43397) (PGR96-001).
Plant Physiology 110: 1047-526

Liscum, E. & Hangarter, R.P. (1991)

Arabidopsis mutants lacking blue-light dependent inhibition of hypocotyl elongation.
Plant Cell 3: 685-694

Liscum, E. & Hangarter, R.P. (1993)

Photomorphogenic mutants *Arabidopsis thaliana* reveal activities of multiple photosensory systems during light-stimulated apical-hook opening.
Planta 191: 214-221

Löser, G. & Schäfer, E. (1986)

Are there several photoreceptors involved in phototropism of *Phycomyces blakesleeanus*? Kinetic studies of dichromatic irradiation.
Photochem. Photobiol. 43: 195-204

Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998)

Bioanalytik
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Malhotra, K., Kim, S. T., Batschauer, A., Dawut, L. & Sancar, A. (1995)

Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with high-degree of sequence homology to DNA photolyase contain the 2 photolyase cofactors but lack DNA repair activity.
Biochemistry 34: 6892-6899

Malmström, S., Åkerlund, H. E. & Askerlund, P. (2000)

Regulatory role of the N terminus of the vacuolar calcium-ATPase in cauliflower.
Plant Physiology 122: 517-526

Martín-Rojas, V., Greiner, H., Wagner, T., Fukshansky, L. & Cerdá-Olmedo, E. (1995)

Specific tropism caused by ultraviolet C radiation in *Phycomyces*.
Planta 197: 63-68

Masih, N. & Misra, P. C. (2001)

Ca²⁺ uptake and plasma membrane depolarization associated with blue light-sensitive exogenous NADH oxidation by *Cuscuta* protoplasts.
J. Plant Physiol. 158: 29-34

Meier, S. (2001)

Graviperzeption in *Phycomyces blakesleeanus*: zur Funktion oktaedrischer Proteinkristalle und ihrer Genetik.
Staatsexamensarbeit, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

Mohr, H. & Schopfer, P. (1992)

Pflanzenphysiologie.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

Morita, M. T., Kato, T., Nagafusa, K., Saito, C., Ueda, T., Nakano, A. & Tasaka, M. (2002)

Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in *Arabidopsis*
The Plant Cell 14: 47-56

Mülhardt, C. (2002)

Molekularbiologie / Genomics.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

- Müller, E. & Loeffler, W. (1992)**
Mykologie.
Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Ng, W. O., Grossman, A. R. & Bhaya, D. (2003)**
Multiple light inputs control phototaxis in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803.
J. Bacteriol. 185: 1599-1607
- Ninu, L., Ahmad, M., Miarelli, C., Cashmore, A. R. & Giuliano, G. (1999)**
Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light.
Plant J. 18: 551-556
- Ninnemann, H. (1984)**
The nitrate reductase system.
In: Blue light effects in biological systems (Senger, H., Hrsg.): 95-109
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S. & Forgac, M. (2003)**
Expression and function of the mouse V-ATPase d subunit isoforms.
J. Biol. Chem. 278: 46396-46402
- Omodeo, P., (1979)**
The photoreceptive apparatus of flagellated algal cells: comparative morphology and some hypotheses on functioning.
In: Photoreception and sensory transduction in aneural organisms
NATO ASI Series (Lenci, F. and Colombetti, G., Hrsg.) 127-153, Plenum Press, New York, London
- Ootaki, T., Ito, K., Abe, M., Lazarova, G., Miyazaki, A. & Tsuru, T. (1995)**
Parameters governing gravitropic response of sporangiophores in *Phycomyces blakesleeianus*.
Mycoscience 36: 263-270
- Ootaki, T. & Miyazaki, A. (1993)**
Genetic Nomenclature and strain catalogue of *Phycomyces*.
Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Japan
- Ootaki, T. & Wolken, J. J. (1973)**
Octahedral crystals in *Phycomyces* II.
J. Cell Biol. 57: 278-288
- Ootaki, T., Lighty, A. C., Delbrück, M., & Hsu, W.-J. (1973)**
Complementation between mutants of *Phycomyces* deficient with respect to carotenogenesis.
Mol. Gen. Genet. 121: 57-70
- Otto, M. K., Jayaram, M., Hamilton, R. M. & Delbrück, M. (1981)**
Replacement of riboflavin by an analogue in the blue-light photoreceptor of *Phycomyces*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 266-269
- Park, H. W., Kim, T., Sancar, A. & Deissenhofer, J. (1995)**
Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*.
Science 269: 1866-1872
- Perotta, G., Yahoubyan, G., Nebuloso, E., Renzi, L. & Giuliano, G. (2001)**
Tomato and barley contain duplicated copies of cryptochrome 1.
Plant Cell and Environment 24: 991-997
- Pilet, P. E. (1956)**
Sur l'apogéotropisme du *Phycomyces*.
Experientia 12: 148-149
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S. & Matthies, H. (1975)**
Reliable micromethod for determining the protein content in tissue material.
Acta Biol. Germ. 34: 1441-1446
- Presti, D. E. & Galland, P. (1987)**
Photoreceptor biology of *Phycomyces*.
In: *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo, E. & Lipson, E. D., Hrsg.)
Cold Spring Harbour Laboratory

Presti, D., Hsu, W.-J. & Delbrück, M. (1977)

Phototropism in *Phycomyces* mutants lacking β -carotene.
Photochem. Photobiol. 26: 403-405

Reymond, P., Short, T. W., Briggs, W. R. & Poff, K. L. (1992)

Light-induced phosphorylation of a membrane protein plays an early role in signal transduction for phototropism in *Arabidopsis thaliana*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4718-4721

Römpp (1995)

Lexikon der Chemie auf CD-ROM
Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Roncero, M. I. G., Zabala, C. & Cerdá-Olmedo, E. (1984)

Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on *Phycomyces* spores.
Mutat. Res. 125: 195-204

Russo, V. E. A. (1977)

Ethylene-induced growth in *Phycomyces* mutants abnormal for autochemotropism.
J. Bacteriol. 130: 548-551

Russo, V. E. A. & Galland, P. (1980)

Sensory physiology of *Phycomyces blakesleeana*.
In: Structure and Bonding 41: 70-110
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Sack, F. (1997)

Plastids and gravitropic sensing.
Planta 203: 63-68

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989)

Molecular cloning – A laboratory manual.
Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

Sancar, A. (2003)

Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.
Chem. Rev. 103: 2203-2237

Schimek, C., Eibel, P., Grolig, F., Horie, T., Ootaki, T. & Galland, P. (1999a)

Gravitropism in *Phycomyces*: a role for sedimenting protein crystals and floating lipid globules.
Planta 210: 132-142

Schimek, C., Eibel, P., Horie, T., Galland, P. & Ootaki, T. (1999b)

Protein crystals in *Phycomyces* sporangioophores are involved in graviperception.
Adv. Space Biol. 24: 687-696

Schmidt, W. (1980)

Physiological bluelight reception.
In: Structure and Bonding 41: 1-44
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Schmidt, W. (2000)

Optische Spektroskopie.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Schmidt, W. & Galland, P. (1999)

Light-induced absorbance changes in *Phycomyces*: evidence for cryptochrome- associated flavosemiquinones
Planta 208: 274-282

Schmidt, W. & Galland, P. (2000)

Gravity-induced absorbance changes in *Phycomyces*: a novel method for detecting primary responses of gravitropism.
Planta 210: 848-852

Schmidt, W., Galland, P., Senger, H. & Furuya, M. (1990)

Microspectrophotometry of *Euglena gracilis*. Pteri- and flavinlike fluorescence in the paraflagellar body.
Planta 182: 375-381

Sedbrook, J. C., Chen, R. & Masson, P. H. (1999)

ARG1 (Altered response to gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1140-1145

Segel, I. V. (1976)

Biochemical calculations.
Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto

Seger, N. D. (2001)

Molekularbiologische Untersuchungen zu vakuolären Proteinkristallen (Statolithen) von *Phycomyces*:
Klonierung und Expressionstudien.
Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

Shropshire, W., Jr., Withrow, R. B. (1958)

Action spectrum of phototropic tip-curvature of *Avena*.
Plant. Physiol. 33: 360-365

Siefermann-Harms, D., Fritz, B. & Ninnemnn, H. (1985)

Evidence for a pterin derivate associated with the molybdenum cofactor of *Neurospora crassa* nitrate reductase.
Photochem. Photobiol. 42: 771-778

Sievers, A. & Hensel, W. (1982)

The nature of graviperception.
In: Plant Growth Substances (Warein, Hrsg.), 499-506 Academic Press, London,
New York

Sievers, A., Kramer-Fischer, M., Braun, M. & Buchen, B. (1991)

The polar organization of growing *Chara* rhizoid and the transport of statoliths are actin-dependent.
Bot. Acta. 104: 103-109

Sineshchekov, V. A., Geiß, D., Sineshchekov, O. A., Galland, P. & Senger, H. (1994)

Fluorimetric characterization of pigments associated with isolated flagella of *Euglena gracilis*: evidence for energy migration.
J. Photochem. Photobiol. 23: 225-237

Small, G. D., Min, B. & Lefebvre, P. A. (1995)

Characterization of *Chlamidomonas reinhardtii* gene encoding a protein of the DNA photolyase / blue light photoreceptor family.
Plant Mol. Biol. 28: 443-454

Somers, D. E., Devlin, P. F. & Kay, S. A. (1998)

Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock.
Science 282: 1488-1490

Song, P. S. & Moore, T. A. (1974)

On the photoreceptor pigment of phototropism and phototaxis: is a carotenoid the most likely candidate?
Photochem. Photobiol. 19: 435-441

Strasburger, E. (1991)

Lehrbuch der Botanik.
Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart Jena New York

Sutter, R. P. (1975)

Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 127-130

Thornton, R. M. (1968)

The fine structure of *Phycomyces* II. Organization of the stage I sporangiophore apex.
Protoplasma 66: 269-285

Thornton, R. M. (1969)

Crystalloids of *Phycomyces* sporangiophores: nature and photosensitive accumulation.
Plant Physiol. 44: 861-865

Thornton, R. M. (1973)

New photoresponses of *Phycomyces*.
Plant Physiol. 51: 570-576

Thornton, R. M. & Thimann, K. V. (1964)

On a crystal-containing body in cells of the oat coleoptile.
J. Cell Biol. 20: 345-350

Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T. & Ikenaga, M. (1996)

Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family.
Science 272: 109-112

Tröster, S. (2000)

Interaktion von Licht- und Schwerereizen in der Sporangiotheca von *Phycomyces blakesleeana*.
Staatsexamensarbeit, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

Varjú, D., Edgar, L. & Delbrück, M. (1961)

Interplay between the reactions to light and gravity in *Phycomyces*.
J. Gen. Physiol. 45: 47-58

Volkman, D. & Sievers, A. (1979)

Graviperception in multicellular organs.
Encyclopedia of Plant Physiology (7), Physiology of Movements: 573-600 (Haupt, W. & Feinleib, M. E., Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Wang, B., Jordan, S. P., & Schuman Jorns, M. (1988)

Identifikation of pterin derivative in *Escherichia coli* DNA photolyase
Biochemistry 27: 4222-4226

Wolken J. J. (1969)

Microspectrophotometry and the photoreceptor of *Phycomyces*.
I. J. Cell Biol. 43 : 354-360

Wolken J. J. (1972)

Phycomyces: a model photosensory cell.
Int. J. Neuroscience 3: 135-146

Worthington, E. N., Kavakli, I. H., Berrocal-Tito, G., Bond, B. E. & Sancar, A. (2003)

Purification and characterization of three members of the photolyase / cryptochrome family blue-light photoreceptors from *Vibrio cholerae*.
J. Biol. Chem. (published ahead of print)

Yamamoto, K., Okano, T. & Fukuda, Y. (2001)

Chicken pineal Cry genes: light-dependent up-regulation of cCry1 and cCry2 transcripts.
Neurosci. Lett. 313: 13-16

You, W. W., Haugland, R. P., Ryan, D. K. & Haugland, R. P. (1997)

3-(4-Carboxybenzoyl)quinone-2-carboxyaldehyde, a reagent with broad dynamic range for the assay of proteins and lipoproteins in solution.
Anal. Biochem. 244: 277-282

Zalokar, M. (1969)

Intracellular centrifugal separation of organelles in *Phycomyces*.
J. Cell Biol. 41: 494-509

Zheng, J., Trudeau, M. C. & Zagotta, W. N. (2002)

Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB subunit.
Neuron 36: 891-896

Artikel in Fachzeitschriften

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Eibel, P., Schimek, C., Fries, V., Grolig, F., Schapat, T., Schmidt, W., Schneckenburger, H., Ootaki, T., & Galland, P. (2000)

Statoliths in *Phycomyces*: Characterization of octahedral protein crystals.
Fungal Gen. Biol. 29: 211-220

Fries, V., Krockert, T., Grolig, F. & Galland, P. (2002)

Statoliths in *Phycomyces*: spectrofluorometric characterization of octahedral protein crystals.
J. Plant Physiol. 159: 39-47

8 Abbildungsverzeichnis

1	Mechanismus der DNA-Photolyase aus <i>Escherichia coli</i>	4
2	Modell des Blaulicht-Photorezeptors in <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	6
3	Strukturformel von Riboflavin, FMN und FAD	7
4	Absorptionsspektren der drei Oxidationszustände des Flavinchromophors und deren Interkonversion durch Elektronentransfer	7
5	Strukturformel von Pteridin und Pterin	9
6	Absorptionsspektren der drei Oxidationsstufen von 6,7-Dimethylpterin	9
7	Lebenszyklus von <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	11
8	Apikalbereich der Stadium I-Sporangioaphore von <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	14
9	Einzelkristalle, Kristallaggregate und zeitlicher Verlauf der Kristallsedimentation	15
10	Modell der Interaktion der Signaltransduktionsketten von Photo- und Gravitropismus	17
11	Erntereife Petrischalenkultur von Stadium I-Sporangioaphoren der Mutante <i>C171</i>	26
12	Transmissionsbereiche der Farbgeläser für die Myzel- und Sporangioaphorenanzucht der Expressionsanalyse mit den resultierenden Bestrahlungsstärken	27
13	Einzelne Stadium IVb-Sporangioaphore in Vial	27
14	Ablauf der Vorreinigung der oktaedrischen Kristalle	30
15	Strukturformel des Zentrifugationsmediums Nycodenz	31
16	Ablauf der Nachreinigung der oktaedrischen Kristalle	33
17	Prinzipdarstellung eines Fluorometers mit Anregungs- und Emissionsstrahlengang	36
18	Absorptionsspektren der drei Oxidationszustände des Flavinchromophors	37
19	Idealisiertes Polarisationspektrum eines hypothetischen Moleküls	38
20	Wellenlängenabhängiger Faktor zur Korrektur der Fluoreszenzanregungsspektren	40
21	Korrigierte und unkorrigierte Anregungs- und Emissionsspektren von Flavin	40
22	Ablauf der Riboflavin-Bindungsexperimente	41
23	Kalibriergerade für Riboflavin-Bindungsexperimente	43
24	Aufbau eines Kapillarblots für den Nukleinsäuretransfer auf Membranen	60
25	Vertikale Flachgel-Apparatur für Protein-Elektrophorese	78
26	Eichkurve für Amidoschwarz-Proteinbestimmung	79
27	Eichgerade für CBQCA-Proteinbestimmung	80
28	Tankblot-Anlage für Proteintransfer auf Membranen	83
29	Zentrifuge für Gravitropismusexperimente	84
30	Balancebox für tonische Bestrahlung	85
31	Prinzipdarstellung und Transmissionsbereich der tonischen Bestrahlung	86
32	Prinzipdarstellung des gravitropen Beugungswinkels	89
33	Absorptionsspektrum isolierter Kristalle der Mutante <i>C171</i>	91
34	Unkorrigierte Fluoreszenzanregungsspektren von <i>C171</i> -Kristallen in den drei Redoxzuständen. Emission bei 530 nm	92
35	Korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren von <i>C171</i> -Kristallen in den drei Redoxzuständen. Emission bei 530 nm	93

36	Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-red“ von <i>C171</i> -Kristallen. Emission bei 530 nm	94
37	Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-red“ von <i>C171</i> -Kristallen. Emission bei 440 nm	95
38	Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektren teilreduzierter <i>C171</i> -Kristalle. Emission bei 530 nm	96
39	Vergleich von korrigiertem Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-DTT“ von <i>C171</i> -Kristallen mit Emission bei 530 nm mit Absorptionsspektrum von Riboflavin.....	96
40	Vergleich von korrigiertem Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „DTT-red“ von <i>C171</i> -Kristallen mit Emission bei 530 nm mit Absorptionsspektrum von L-Monapterin.....	97
41	Korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren von <i>C171</i> -Kristallen in den drei Redoxzuständen. Emission bei 440 nm	97
42	Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-DTT“ von <i>C171</i> -Kristallen. Emission bei 440 nm	98
43	Fluoreszenzemissionsspektren von <i>C171</i> -Kristallen in den drei Redoxzuständen. Anregung bei 470 nm	99
44	Fluoreszenzemissionsspektren „ox-red“ von <i>C171</i> -Kristallen. Anregung bei 470 nm.....	100
45	Fluoreszenzemissionsspektren „ox-red“ von <i>C171</i> -Kristallen. Anregung bei 350 nm.....	100
46	Fluoreszenzemissionsspektren „ox-red“ von <i>C171</i> -Kristallen. Anregung bei 380 nm.....	101
47	Fluoreszenzemissionsspektren von <i>C171</i> -Kristallen. Anregung bei 470 nm	101
48	Vergleich von Fluoreszenzemissionsspektren „ox-DTT“ von <i>C171</i> -Kristallen mit Emissionsspektrum von Riboflavin. Anregung bei 470 nm.....	102
49	Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren von <i>C171</i> -Kristallen mit Riboflavin / L-Monapterin-Gemisch.....	103
50	Unkorrigierte Fluoreszenzanregungsspektren von <i>WT</i> -Kristallen der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert und reduziert. Emission bei 530 nm	104
51	Korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren von <i>WT</i> -Kristallen der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert und reduziert. Emission bei 530 nm	104
52	Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-red“ von <i>WT</i> -Kristallen. Emission bei 530 nm	105
53	Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-red“ von <i>WT</i> -Kristallen. Emission bei 530 nm	106
54	Korrigierte Fluoreszenzanregungsdifferenzspektren von <i>WT</i> -Kristallen. Emission bei 530 nm.....	107
55	Vergleich von korrigiertem Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-DTT“ (Emission bei 530 nm) mit dem Absorptionsspektrum von Riboflavin.....	107
56	Korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren von <i>WT</i> -Kristallen der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert und reduziert. Emission bei 530 nm	108
57	Vergleich von korrigiertem Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-DTT“ (Emission bei 530 nm) mit dem Absorptionsspektrum von Riboflavin.....	109
58	Korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren von <i>WT</i> -Kristallen der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert und reduziert. Emission bei 440 nm	110
59	Korrigiertes Fluoreszenzanregungsdifferenzspektrum „ox-DTT“ von <i>WT</i> -Kristallen. Emission bei 440 nm	110

60	Fluoreszenzemissionsspektren von <i>WT</i> -Kristallen der Oxidationsstufen oxidiert, teilreduziert und reduziert. Anregung bei 470 nm	111
61	Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum „ox-red“ von <i>WT</i> -Kristallen. Anregung bei 470 nm	112
62	Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum „ox-red“ von <i>WT</i> -Kristallen. Anregung bei 380 nm	112
63	Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum „ox-red“ von <i>WT</i> -Kristallen. Anregung bei 350 nm	113
64	Fluoreszenzemissionsdifferenzspektren von <i>WT</i> -Kristallen. Anregung bei 470 nm.....	114
65	Vergleich von Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrum „ox-DTT“ von <i>WT</i> -Kristallen mit Emissionsspektrum von Riboflavin. Anregung bei 470	114
66	Fluoreszenzexcitations- und -emissionsspektren des Überstandes aus methanolischer Extraktion von <i>C171</i> -Kristallen.....	115
67	Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren des Überstandes aus der methanolischen Extraktion von <i>C171</i> -Kristallen mit einem wässrigen Gemisch aus Riboflavin und L-Monapterin. Emission bei 530 nm, Anregung bei 470 nm	116
68	Korrigierte Anregungsspektren von unbehandeltem (oxid.) und nachfolgend reduziertem Riboflavin. Emission bei 530 nm.....	118
69	Emissionsspektrum von unbehandeltem (oxid.) Riboflavin. Anregung bei 365 nm.....	118
70	Emissionsspektrum von unbehandeltem (oxid.) Riboflavin. Anregung bei 455 nm.....	119
71	Emissionsspektrum von unbehandeltem (oxid.) Riboflavin. Anregung bei 425 nm.....	119
72	Emissionsspektrum von unbehandeltem (oxid.) Riboflavin. Anregung bei 470 nm.....	120
73	Emissionsspektrum von unbehandeltem (oxid.) L-Monapterin. Anregung bei 356 nm.....	120
74	Korrigierte Anregungsspektren von unbehandeltem und reduziertem L-Monapterin. Emission bei 440 nm	121
75	Emissionsspektrum von unbehandeltem (red.) NADH. Anregung bei 340 nm.....	122
76	Korrigierte Anregungsspektren von unbehandeltem (red.) und oxidiertem NADH. Emission bei 460 nm	122
77	Emissionsspektren von Natriumphosphatpuffer/ddH ₂ O mit allen Zusätzen. Anregung bei 470 nm	123
78	Korrigierte Anregungsspektren von Natriumphosphatpuffer mit allen Zusätzen. Emission bei 440 nm	124
79	Emissionsspektren von Natriumphosphatpuffer mit allen Zusätzen. Anregung bei 390 nm	124
80	Polarisationsspektren von <i>C171</i> - und <i>WT</i> -Kristallen	125
81	Vergleich des korrigierten und unkorrigierten Anregungsspektrums mit dem Absorptionsspektrum von 10 ⁻⁶ M Riboflavin in 0,1M Natriumphosphatpuffer.....	126
82	Dichteverteilung der 500µl-Fractionen entlang des Nycodenzgradienten in Abhängigkeit von der Summe der Fluoreszenzemission für pterin- und flavinartige Pigmente	127
83	Riboflavin-Bindungsexperiment: Vergleich von <i>C171</i> - und <i>WT</i> -Kristallen	128
84	Riboflavin-Bindungsexperiment mit <i>C171</i> -Kristallen.....	129
85	Abhängigkeit der Konzentration gebundenen Riboflavins von der Konzentration exogen angebotenen Riboflavins im Bindungsexperiment mit <i>C171</i> - und <i>WT</i> -Kristallen	130
86	Abhängigkeit der Riboflavinbindung vom Redoxzustand im Bindungsexperiment mit <i>C171</i> -Kristallen	131
87	Scatchard-Plot der Riboflavin - Bindung in Abhängigkeit vom Redoxzustand der Kristalle.	131

88	Bindungsexperiment mit <i>C171</i> -Kristallen nach differenzieller Zentrifugation über Saccharosekissen. Korrigierte Anregungsspektren mit Emission bei 530 nm	132
89	Vergleich der gewaschenen <i>C171</i> -Kristalle aus dem Bindungsexperiment nach differenzieller Zentrifugation über Saccharosekissen mit 10^{-6} M Riboflavin. Emission bei 530 nm	133
90	SDS-PAGE des Rohextraktes und oktaedrischer Kristalle der Mutante <i>C171</i>	135
91	Sequenz der aus der 55kDa-Proteinuntereinheit abgeleiteten Oligonukleotid-Sonde <i>VFphy55</i>	136
92	Restriktionsverdau und Autoradiogramm von Gesamt-DNA aus Wildtyp und Mutante <i>C171</i>	137
93	Repräsentative Audioradiogramme von Plaquelift-Hybridisierungen aller drei Screeningrunden	138
94	Restriktionsmuster der Klone enthaltenden λ <i>GEM11</i> -Phagen	138
95	Autoradiogramm des Restriktionsmusters der Klone enthaltenden λ <i>GEM11</i> -Phagen	139
96	Sequenzpaarung und Position der degenerierten Oligonukleotidsonde <i>VFphy55</i> im 1kb- <i>Bam</i> HI-Fragment des Klons 55-18 aus genomischer DNA des <i>Phycomyces</i> –Wildtyps	140
97	Einzel- und Doppelverdaue des Klons 55-18	141
98	Kartierung des Gesamtabschnittes, der die für <i>VFphy55</i> codierende Region trägt	142
99	Sequenz der Northernblotsonde <i>VFphy55r</i>	143
100	Autoradiogramme der Northernblots von Gesamt-RNA aus Myzel und SI-Sporangiophoren	144
101	Beugungswinkel der vier Stämme <i>MR14</i> , <i>MR18</i> , <i>MR74</i> und <i>MR77</i> bei tonischer Rotlicht-Bestrahlung (612 nm, $0,5 \text{ W/m}^2$)	146
102	Relative Beugung der vier Stämme <i>MR14</i> , <i>MR18</i> , <i>MR74</i> und <i>MR77</i> bei tonischer Rotlicht-Bestrahlung (612 nm, $0,5 \text{ W/m}^2$)	147
103	Beugungswinkel der vier Stämme <i>MR14</i> , <i>MR18</i> , <i>MR74</i> und <i>MR77</i> bei tonischer Rotlicht-Bestrahlung (612 nm, 10^{-8} W/m^2)	148
104	Relative Beugung der vier Stämme <i>MR14</i> , <i>MR18</i> , <i>MR74</i> und <i>MR77</i> bei tonischer Rotlicht-Bestrahlung (612 nm, 10^{-8} W/m^2)	148
105	Gravitroper Beugungswinkel der vier Stämme <i>MR14</i> , <i>MR18</i> , <i>MR74</i> und <i>MR77</i>	149
106	Relatives Längenwachstum der vier Stämme <i>MR14</i> , <i>MR18</i> , <i>MR74</i> und <i>MR77</i>	150
107	Absolute Längenzunahme der vier Stämme <i>MR14</i> , <i>MR18</i> , <i>MR74</i> und <i>MR77</i>	151
108	Abhängigkeit der absoluten Längenzunahme der Stämme <i>MR74</i> und <i>MR77</i> von der Ca^{2+} -Konzentration im Inkubationsmedium	152
109	Abhängigkeit der relativen Längenzunahme der Stämme <i>MR74</i> und <i>MR77</i> von der Ca^{2+} -Konzentration im Inkubationsmedium	153
110	Abhängigkeit der relativen Längenzunahme der Stämme <i>MR74</i> und <i>MR77</i> von der EGTA-Konzentration im Inkubationsmedium	154
111	Abhängigkeit der relativen gravitropen Beugung der Stämme <i>MR74</i> und <i>MR77</i> von der Ca^{2+} -Konzentration im Inkubationsmedium	155
112	Abhängigkeit der gravitropen Beugung der Stämme <i>MR74</i> und <i>MR77</i> von der Ca^{2+} -Konzentration im Inkubationsmedium	156
113	Abhängigkeit der gravitropen Beugung der Stämme <i>MR74</i> und <i>MR77</i> von der EGTA-Konzentration im Inkubationsmedium	157

9 Anhang

Nukleotidfolge der sequenzierten, für die 55kD-Kristall-Proteinuntereinheit codierenden Region aus der genomischen DNA-Bank von *Phycomyces blakesleeanus*

GCCCMCCYAACCSAGGCGCCAACCARAAGCCAACAACGTACAYAA YMACTAGGGSCBCSACACCCCYGGG
ACACCCCCCCCCMACGGCWATMCCTCTCTCTAARCAGACWCACMAAGASCDGAARCAAAAAAACCATACA
ATSCGNDAAAGACCGCCAYCGAAGAAAGGCCCWCMCACMCMCMCACCCRCMCCCMCAMAMAMAMARAKAA
ACACAKAAACABACAGAGTACACCGAACCCAAGCAGACTCCCWCAAGGADCAGMACGACCCCGCTATTA
TAACCAAATATCTTAGAAAGGTCCCATTATCCAATTCCACAAATTACCTYGCAATAGGCATCGTTTCATAT
CCTWATAAGTCTCCTCAGCAACAGCCAAAAATTGTGCAGAGTTCCACTTGTCAAACCTGGGACTTGTACTT
AATCAAACCTACACTGTATCACATYTYTTTGGTGGTCCCTTATCAGACAATAAAATTCACAACAATTGTA
ACCGTGCCTTTATTGTATTGTATCTTATTTTACCTGAGCAAATTCTGTGCGTTATTTCATCAAGTTACGCC
ACTTGTAAGACGCCAGTTCTTAAAGTCAGTGATAGGTGGTGCAGTATCAGAAGGAATGTAGTTGGCTAA
CGAAACGTAATACGAATATGTACACAGCACATAGGAAGAATAGGAATAACAGAAGTAATAGAAGTAATAA
TAAAGGCAATTCACTATAAGTCTCAATTCTCGCTCAGTTTATATATTGTTTCTTCTCTACCAAAGACGCC
ATGGTCGCGCATGAGGACAAGCTTTCCAGGAGCGTCCCTGGTGGCATATGTACGGATGCTCAAAAGTGCC
GACTTGGCGACCACAGAACCGATGGGCTGCTGGGTCTGGCTTGCCAGAAACAGTCGATTGGCGGGCCA
AGGTTGCGAATCTGAGGCTACGTAAATTAGATGCCATGCTTAAAGCTTATTATACACACAAAAATAAAA
CTAAAAAAAATAGAGTATAATAGGTTTCTCCAGGTTTAGGGGAAGGGTTCCTTCCCCGGGATCCAGTCA
CATCCCCTGTCCCTGTATAGCATTGAGTGGCTTGGAAGAGCTCACGTGCCTTGAGCACAATGCGTGAGTT
CGCGGGAAAACCTCAAGCTCTTGAAGAGAACGCCATGTTTAAAAAGGGAACCTCGCATAAAGAACATTTCGT
CGCAAGATAGAAACCAGCGACGATGAAAGCCAAGATAAAACCAACAGTACGAACTATATCATCACATTA
TTACATAAATATCTGAGTGGTTTACCCTAGTTGAGACCGAAGTAAAGCAAACCATCACAAAGAGTTTGGT
TGAAAAGAAAAAGAAGAAAGAAATCTAAGACATCACTCGGCCTGAGTTTTGAAGATGAGGCAAGCACAGAA
TCTTAATTTGAAGATGAGCAAGCACAGATCTTAATGAAAATTACGAAGACAACGACGAAAAATAAACGCC
AAATTGACCCTGAGCGCATAATTTTAAATAGGAAGAAGAAGAAAGTACATTCCAAATTA AAAAGAGTAAAG
CCAGTCGACGGTTAGCTACCGGACGCACATTACCAACATTAGAGTGAGTGAGGCTTTGCTGCGAAGAGCA
TATATTTTTGAATTTTGCTGATTATTTTAAAAGTTCCACCGAAAAATCCAATGAAGATACCACATCATCA
GCATCGTACACTGCAGAATTACTTGAATCGCTTCGTGCAAACACACCAAGCATGCCTGCAAATTTAAAGA
ATTTCGACCATGACCGACGATGAAGCTCTATTGGCAGAAAAGTTTCTTACACTGATGAATGCTCAGATTGG
ATCTACAGGAATACCTGATGCTAATGCTATTTCATGCTGCAAAAAGAAGCGTGAATTGTTACGTAAAGGT
GTTTACATTGTGGATCAAGAAGATGACTTTATTTCTCTGGACAGTGTAAGTTATGGGAGTAAATGTCATG
TGCCGTGGAGAATTC AATTGACTTATTTGGAATTTTACCTCAGGCAACAGAAAACCTCACGCTTAATACGT
GAAGAAGATGAAATTGGGGATGATGGTGGCGCAGGTAATTTACCCATAGACACATAAAATGAAGGATATG
ATGAYCTATTATTAGAACTAGAGTATGAGAGATATGTTGGCGAAGACCTCTCCTTGAACAAGTCTACTG
CAAAAAACAGGCAAAGGAACGTAGGGATGGCGTAAGAGAGATGATTGAAGTTGCTCAGGAAGATGATGA
AGATGAAGACGACTTGGCACGATGGGAGAAGGATATGATAAAGAACGGAGGAGTGCGATCCCAGTATAAT
CATGCCGAAAAGGATCCTTTCAAACACCCCCTAGATTATAAATCTGCTCAGAGTAAGCCAAGGAGACGAT
TAGATCAAATCCTTAATTCTAACAGCTAAGTTTTATAGTTCCGTTGGAACTACTCTGCCAAGTATGGCG
GATGTCATGCTTAGACTTGATGTGACATCTAGCCAATTGACCCACTCTCTCGATGAAGAAGGCACTCAGA
TCAAAAACGCTGAGAAGAATCTGAAGAATGCTAATGCATCTACAGAAGACCTTGATAAAGAGATCGAACG
TTCCAGCAAACGATACAAC TACTTCCAGGAACCTTATGGGTTATGTGAATGATCTTGGTGAGATGTTGGAT
ACAAAGGTAAGAACATACAAATGGATTTGTTTTTCTTTGGTAATAAATCAAGTATACACAATTTACTCAT
TTAACTAGTTCCCTGAATTGACTAACTGGAGGAGGAAGCCCATGCTCTGTTCTTCACAAAGTACGAAGT
AGTTACTGAACGACGATGGGAGGATGATTTGGATGATCTCTCTTTGTTTGCTATTCTCCCCCAAATGGAA
GAAGTTGAAAGCGAACAAGTTGATGAATTTGGTCGGGTGATTGAGGTAAAATCCTCTGAAAGCTCTCGCC
AACGAAGAAGAGAAGAACGTGCAGCACGGATACGAAAGAGAGATATGGAAGATGAGGATGTGGCTATGTG
GACCGATGATGATATGCAAGAAGAATGGGTGTTGCAAAAAGAAGACAGGCTAGGTATTTCACTTATCGCG
AGCTTGACATGTGTATATCCTAACATTGCTTATTTCTCTTTCTCTTTAAACAGAGACAATTCGGACGCAG
AAGATAGCTGATCTCCTTTCTGATGTGAGCGATGATTTCAAGCCATTGCGTTCAAGTATGGATCGATTG
GGGCTTGGAAGACAGAGTTCTATGATGACTATCAAAGGCATTTGGCAGTTTGAGTTTGCCAGGTGCATT

TGAGTTCTATGTGCGATGCGAGCTCGTGTTCATGGGATCCCTTTGAGGTATGCTATTAAGTCAAGTCATCA
AGCCTCCCTTTTGTGGGTGAATTAACAATAAGGGGTTTATAGGAAGCAATTGATTTTCGATTCAATGAGGT
GGCATTCTGTCTGTGCTGACTATGGTGTGATTGAAGGAGAGGATGGACATGAAGATGCAGATGTGGAAC
TATTGAATAAGGTGGTTGAGAAGGTGTTGATCAAAAAGACTAAAGGGACTGTTGGACATTTTGAATCCTGC
CTCGACAAGGGAGATGCGCCACGCTGCCCAAGCGTTTGAACAGGTCTCTTACTATGTTGAAAAGAAGGAG
AATGCTTATCAGGTAAAGAGAATGTGGTAAAAATAGCGAGACCGACTAAAAAAAATCTTACTTTTTGCCT
CCTTTGTTTCCAGGATCTTATTAGTGCAGTGATATCCAGTTTGGAGAGGCAATTAATACGCTATGCAGAC
TTCATTGAGCGTGTATCACTCAAACTGATATAGACGAAAAGGCTAAGTTGGCCAAGTCACGGTTCTTCC
ATCGCCAGTGTAAGTAAGAAATATGACTACAAGGTTTGAAGCTAAATCTGATTTTTTAAATAGT
ATCTCAAGACATTGACCTTCTGGCGTCGATATATCCCCAAAGACACCCTGTCAGTGCTGGGTGACATGGT
GATGAACCGAATCCTCGCCCCCTTTGTTGCGACCTCGTCTAGATGCCCAAGATAGCCAAGTACAGGCACAT
GGCTTAGAATTGCTAGCTCGTATTCAACAATAATAACACGCATTTTTTACACCTTTTGTAGCAGAGATAA
TAATGGCAAATGTATAAAATTAATTGGCAGGAGCATGTACACAAGTCTTAATTGAATCTATCTTCTTCGC
TTGATGCGGGAAGGATGACTCTGAATGGGTCTGCCAGTCGCTGCAGTTGAGTTAAACCTGGCTTAGCTA
TAATCTGGATATGCACAGCCGAGTTCGTTCTCTCCTGTGTCTCAGGTCTTCATCCTATATACACAATACA
TATCAACCTTCACATCCCCAATTTCTCCCTCGTTTTAACATATTCTATACACTCCTTGGGAATATATAGC
TCACCATGTCTTCTGGAACGACGTCATCCACTAGAACACACTTTCTGTGGTAGGTTTAAGATCCACTTG
GTGATTCATAGCTTCTGAAACAGCCAATGCCACTGACAGACAGTTTTTAATTGTTGCTCCCAAAGCATGC
AGCGTCACTTTGTTGTTTCTAATTAAGAAATAACAATCATAATTCATGATTGTGTGCATGAATAAATGGA
AGTTTTTTTTATATATTTTTATTATCATTATCATTATAATTATTATTTTTTTACCTCTCATTGATCATAA
GACGTTTTATTCTTTTGACGATCGCAATTGTCTTACTCTTGTGAGATAGGTAGATGTGAGTAGGATCAGC
AGCTGGTCTCTGAGGTGTTCTTTTGTGAATGACACCTAAAGTACAAATCAATCAAGAATGATCTTGCATT
GTGTGTGGAATGCTACCTTCTACTTTCTCCCGTTTATGTTTGTCTAATTCTTTCATTAGTTGCAGATAAA
AACAAAAGAAAGAAAGAAAACGCGGCTCCGACCATTCTCTTAGAGATCATGCCATTTCAAACCTTCGCTT
ACATTGACATTAAAGAGAAAACAATGACTTTGTGTTTTTATTCTTAATTGTAAAAAAAATATGTTTATGC
CTCAACAGCAGCGGGGGCAGCGGGAGCAGGAGCAGGAGTGAAGTCCTGGACAATGGGCTCCTCAACATCG
GTCTCCTCCTTGGGTTCAAGGATAGTGACAATATCGGGAAGAGTGTTCTTGGGTCCATTGCGACCGGTGG
GATCC

Medien für die Bakterienkultur

Ampicillin-Stammlösung

10 mg/ml
in sddH₂O lösen
aliquotieren
Lagerung bei -20°C

LB – Flüssigmedium

1 % NaCl
1 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
→ pH 7,0 mit NaOH

LB – Festmedium

0,5 % NaCl
1 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
1,5 % Bacto Agar
1 mM NaOH

LB – Maltose

1 % NaCl
1 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
0,4 % Maltose
10 mM MgSO₄ • 7 H₂O

→ pH 7,0 mit NaOH

LB – Topagarose

1 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
0,5 % NaCl
0,7 % Agarose
→ pH 7,0 mit NaOH

NZCYM – Flüssigmedium

1 %	Caseinhydrolysat
0,5 %	NaCl
0,5 %	Hefeextrakt
0,1 %	Casaminoacids
0,2 %	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
→	pH 7,5 mit NaOH

SM – Medium

0,58 %	NaCl
0,2 %	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
0,05 M	Tris·HCl (pH 7,5)
0,01 %	Gelatine

TB –Puffer

10 mM	PIPES
15 mM	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
250 mM	KCl
→	pH 6,7 mit KOH
55 mM	MnCl ₂ · 4 H ₂ O
sterilfiltrieren und bei 4°C lagern	

Danksagung

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Paul Galland, danke ich für die Möglichkeit, dieses spannende Thema unter seiner Betreuung bearbeiten und freie Gestaltungsräume innerhalb des Projektes nutzen zu können. Bedanken möchte ich mich bei ihm auch für die stetige Gesprächsbereitschaft und kritische Diskussion sowie die Ermöglichung der Finanzierung.

Besonderer Dank gilt Sigrid Völk und Marco Göttig, die durch technische und moralische Unterstützung sehr viel zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen haben. Nicht zu vergessen sei hier auch Hilde Mengel, die immer bereitwillig sich dem Beseitigen der Spuren gewidmet hat.

Dr. Franz Grolig danke ich für viele wertvolle Tipps und Anregungen, die entspannte Atmosphäre und die Durchsicht des Manuskriptes.

Bei Dr. Sylvia Busch möchte ich mich für das Aufrichten besonders in der Endphase bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer bedanke ich mich für die Hilfe und Unterstützung in allen molekularbiologischen Fragestellungen, für die Nutzung der Einrichtungen und Räumlichkeiten innerhalb seiner Arbeitsgruppe, wie auch für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Batschauer danke ich für das entspannte, nachbarschaftliche Verhältnis und die häufig geleistete Aufbauarbeit, besonders bei Oxana Panajatow für die geduldige Beantwortung der vielen kleinen Zwischen-drin-Fragen und bei PD Dr. Dieter Dörnemann für die Unterstützung bei der Durchführung radioaktiver Arbeiten.

Mein Dank gilt auch Dr. Stefan Zauner für zahlreiche Sequenzierarbeiten.

Ebenso danke ich Dr. Dietmar Linder (Justus-Liebig-Universität Giessen) für die Durchführung der Proteinsequenzierungen.

Volker Fries
Talstraße 29
35112 Fronhausen

Lebenslauf

25.10.1968 geboren in Marburg/Lahn

Schulbildung

1975-1979	Grundschule Fronhausen
1979-1985	Gesamtschule Niederwalgern
1985-1988	Gymnasium Philippinum Marburg
Juni 1988	Abitur

Zivildienst

August 1988-März 1990	Rettungsdienst und Krankentransport DRK Marburg
-----------------------	--

Akademische Ausbildung

WS 1990/91-SS 1996	Biologie-Studium an der Philipps-Universität Marburg mit den Schwerpunkten Botanik, Naturschutz, Biochemie und Mykologie
Juni 1996-Juni 1997	Diplomarbeit zum Thema „Analysen zur Beeinflussung der orientierten Stark- und Schwachlichtbewegung des Chloroplasten der Grünalge <i>Mougeotia</i> durch endogene und exogene Faktoren“
Juni 1997	Erwerb des Diploms an der Philipps-Universität Marburg
Juni-August 1997	Weiterführende Untersuchungen zum Thema der Diplomarbeit
Juli-Oktober 1998	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Labor von Prof. Dr. Michael Bölker im Rahmen des Projektes „Mechanismen der Signalerkennung in <i>Ustilago maydis</i> “. Arbeiten an der „Molekularen Charakterisierung der Pheromonerkennung bei <i>Ustilago maydis</i> “
November 1998-heute	Promotionsstudium an der Philipps-Universität Marburg
Februar 2000-Januar 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Labor von Prof. Dr. Paul Galland im Rahmen des Projektes „Graviperzeption in <i>Phycomyces</i> “

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Thema

**„ Oktaedrische vakuoläre Proteinkristalle in *Phycomyces blakesleeanus*:
Biochemische und fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung”**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 26. März 2004